

GRAZIELA MÜLLER

**ESTEROIDOGÊNESE TESTICULAR DE GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) E SUA RELAÇÃO COM A MORFOLOGIA ESPERMÁTICA E COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DE ESPERMATOZÓIDES DA CAUDA DO EPIDÍDIMO.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração Fisiologia.

Orientador: Profa. Dra. Rosana Nogueira de Moraes

CURITIBA  
2010

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

Ata da Sessão Pública, de exame de tese para obtenção do grau de doutor em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Fisiologia.

Ao(s) dez dias do mês de maio de dois mil e dez, às 08:0h nas dependências do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a banca examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, composta pelos professores: Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior (Universidade Federal Rural de Pernambuco), Dra. Regina de Paula Xavier Gomes (Citologia e Patologia Diagnóstica de Curitiba), Dr. Guilherme Lanzi Sassaki (Universidade Federal do Paraná), Dr. Anderson Martino Andrade (Universidade Federal do Paraná) e Dra. Rosana Nogueira de Moraes (Orientadora e Presidente da Banca Examinadora da Universidade Federal do Paraná), com a finalidade de julgar a tese do(a) candidato(a) *Graziela Müller*, intitulada: "*Esteroidogênese testicular de gatos domésticos (*Felis catus*) e sua relação com a morfologia espermática e composição lipídica de espermatozoides da cauda do epidídimo*", para obtenção do grau de doutor(a) em Biologia Celular e Molecular na área de concentração em Fisiologia. A candidata teve até 60 (sessenta) minutos para a apresentação e cada examinador, teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houver diálogo na argumentação. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa estabelecido pela coordenação do curso, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feitos pelo(a) orientador(a) Dr(a) Rosana Nogueira de Moraes. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela "Aprovação" do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de Doutor(a) em Biologia Celular e Molecular, desde que apresente a versão definitiva da tese conforme regimento interno do programa. Curitiba, 10 de maio de 2010.

*Rosana Nogueira de Moraes*  
Dra. Rosana Nogueira de Moraes  
Orientadora da Universidade Federal do Paraná - UFPR

*Valdemiro Amaro da Silva Junior*  
Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior  
Universidade Federal de Rural de Pernambuco - UFRPE

*Regina de Paula Xavier Gomes*  
Dra. Regina de Paula Xavier Gomes  
Citologia e Patologia Diagnóstica de Curitiba

*Guilherme Lanzi Sassaki*  
Dr. Guilherme Lanzi Sassaki  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

*Anderson Martino Andrade*  
Dr. Anderson Martino Andrade  
Universidade Federal do Paraná - UFPR



CENTRO POLITÉCNICO - CEP 81531-990 JARDIM DAS AMÉRICAS - Caixa Postal 19031 - FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 - E-Mail: [pgbiocel@ufpr.br](mailto:pgbiocel@ufpr.br) - [www.pgbiocel.ufpr.br](http://www.pgbiocel.ufpr.br) CURITIBA - PARANÁ

*Esta tese é dedicada a todos os animais domésticos e selvagens, felinos em especial, que sofrem as piores consequências da ação humana.*

*“Assim como uma pequena planta deve enfrentar muitos obstáculos antes de se transformar numa árvore, nós precisamos experimentar muitas dificuldades no caminho da felicidade absoluta”.*

*Nitiren Daishonin*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu superar todos os obstáculos, me superar e ter força e coragem suficientes para chegar até aqui. Meus mais sinceros e nobres agradecimentos.

À minha mãe, Nelci Müller, que é meu maior exemplo de garra, de luta e de vida. A mulher que inspirou a escolha do meu caminho. Obrigada por estar presente na minha vida, obrigada pelo apoio. Às minhas irmãs, Tatiana e Polyana, pelo apoio e pelo carinho sempre. Ao meu Pai, Henry, pelo carinho.

Ao meu querido amigo e mestre, Prof. Felipe Wouk, por ter me encaminhado, ter se preocupado com meu futuro e pelo apoio durante este período. Por ter me mostrado que eu posso voar com as águias!!!

Aos colegas e amigos do laboratório de Fisiologia da reprodução, sem os quais eu não poderia ter feito absolutamente nada. Obrigada a vocês, antes de tudo, pela amizade. Obrigada pelo apoio, pelo auxílio e por terem me ensinado tudo aquilo que vocês aprenderam. A vocês, Ângela, Andrei, Kethy Maria, Rosa e Katlyn, o meu muito obrigado por tudo, do fundo do meu coração!!

A Sandrinha Maria, amiga querida, que me acolheu em Recife com tanto carinho e me ajudou no processamento de algumas amostras. Obrigada, amiga, por tudo!

Ao Professor Valdemiro pela atenção e carinho. Mas especialmente pela sua colaboração na Histomorfometria testicular da minha tese!!

Ao professor Anderson Andrade, pela boa vontade e auxílio durante o doutorado.

Ao Professor Ricardo, pela boa vontade e prontidão com que providenciou a minha documentação para o Doutorado Sandwich na Alemanha. Obrigada!

À professora Carolina, que com suas sábias palavras soube me orientar para que eu seguisse meu caminho. Obrigada pelo apoio e suporte!!!!

Aos amigos que torceram por mim e que souberam entender os meus momentos de ausência total, meu reconhecimento e gratidão. A Dona Marisa, minha grande amiga, a única que realmente esteve ao meu lado nos meus momentos de glória e de sofrimento. Meu sincero agradecimento pela sua amizade e carinho!!!

Aos meus amigos de Berlin: Fabiano, Ivone, Heiko, Ângela, Roberto, Betânia, Andreas, Maire e Evandro, pelo carinho com o qual vocês me abraçaram e me fizeram sentir em casa, amparada e feliz. Obrigada!!

Ao coordenador do Curso de Medicina Veterinária da UNOESC, Éderson Bortolotto, por ter permitido a realização e viabilização do mutirão de castração dos animais que fizeram parte da minha tese. A todos os alunos da UNOESC que se empenharam e dedicaram seu tempo para ajudar na castração destes gatos. Obrigada pela ajuda, pelo carinho de todos e pelo apoio de vocês.

Ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao Professor Silvio Zanatta, por viabilizar a minha vaga no curso de doutorado e a Marlene, secretária do curso, pela atenção e gentileza sempre. Obrigada!!!

À Capes por viabilizar a realização do meu doutorado Sandwich na Alemanha e por todo o suporte recebido durante os meus cinco meses de permanência.

Ao grupo FG4 do Instituto de Pesquisa para Animais de Zoológico e Selvagem da cidade de Berlin pelo carinho, pela paciência e aprendizado. Em especial, a Frau Franz que dedicou seu tempo para me auxiliar e ensinar e a minha querida Orientadora, Dra Karin Müller, que me mostrou o quanto os alemães podem ser amáveis; o quão comprometidos, responsáveis e pontuais eles são e, ainda, que me orientou e proporcionou uma grande chance de aprendizado intelectual e de vida. Vielen Dank für alles!!

À minha orientadora, Dra Rosana N. de Moraes, pela oportunidade de fazer o doutorado em uma área totalmente diferente, por toda a orientação recebida e pela correção criteriosa do trabalho que resultou nesta tese. Mas, sobretudo, pela maior oportunidade de superação profissional e pessoal que eu tive até o momento na minha vida. Eu sou alguém infinitamente melhor hoje por causa disso. Meus mais sinceros agradecimentos.

À querida amiga, Vânia, que com muita boa vontade conseguiu a maior parte dos animais, que foram castrados para este trabalho.

À Rede de televisão da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio ao projeto.

*Der nächsten Liebe meines Lebens, auf die ich schon lange warte und mit der ich sehr glücklich sein will.*

A todos aqueles que tomaram uma atitude positiva e generosa e assumiram sua responsabilidade diante da roda da vida, contribuindo para que este trabalho fosse realizado. Às vezes falta apenas boa vontade nas pessoas. Minha compaixão aqueles que não a tiveram.

A tudo de maravilhoso e de bom que a vida ainda vai me oferecer e me permitir vivenciar após o término deste doutorado. Meu sincero agradecimento!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1 A REPRODUÇÃO E A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE FELINOS...	1
2 ESPERMATOGÊNESE E ESTEROIDOGENESE NO GATO DOMÉSTICO.	4
2.1 ESPERMATOGÊNESE .....	4
2.2 ESTEROIDOGENESE TESTICULAR .....	7
3 COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA .....	11
4 OBJETIVOS DO PRESENTE ESTUDO .....	18
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19
CAPÍTULO I – PROPORÇÃO ENTRE TESTOSTERONA E ESTRADIOL INTRATESTICULAR EM GATOS DOMÉSTICOS ( <i>Felis catus</i> ) E SUA RELAÇÃO COM A ESPERMATOGÊNESE E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO.....	29
I 1. INTRODUÇÃO .....	30
I 2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
I 2.1 ANIMAIS E ORQUIECTOMIAS.....	34
I 2.2 OBTENÇÃO, ANÁLISE FÍSICA E MORFOLÓGICA DOS ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO.....	35
I 2.3 PREPARAÇÃO DOS TESTÍCULOS.....	36
I 2.4 DETERMINAÇÃO SÉRICA E INTRATESTICULAR DE TESTOSTERONA E 17 $\beta$ -ESTRADIOL .....	37
I 2.4.1 Extração hormonal dos testículos e do soro.....	37
I 2.4.2 Dosagem de testosterona e 17 $\beta$ -estradiol.....	37
I 2.5 ANÁLISE DA ESPERMATOGÊNESE POR HISTOMORFOMETRIA ....	38
I 2.5.1 Morfometria testicular .....	38
I 2.5.2 Contagem e estimativa total do número de células em túbulos seminíferos no estágio 1.....	39
I 2.6 ANÁLISE DA ESPERMATOGÊNESE POR CITOMETRIA DE FLUXO...	41
I 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
I 3. RESULTADOS .....	42
I 3.1 PESO CORPORAL, BIOMETRIA TESTICULAR E PARÂMETROS FÍSICOS DOS ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO.....	42
I 3.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA .....	43
I 3.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICA E INTRATESTICULAR DE TESTOSTERONA E 17 $\beta$ -ESTRADIOL .....	44
I 3.4 ESPERMATOGÊNESE POR HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR....	46
I 3.5 ESPERMATOGÊNESE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	47
I 4. DISCUSSÃO .....	50
I 5. BIBLIOGRAFIA .....	56

<b>CAPÍTULO II – SCREENING OF THE LIPID COMPOSITION OF EPIDIDYMAL SPERMATOZOA FROM DOMESTIC CATS BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY AND ITS CHOLESTEROL AND PHOSPHATE CONTENTS .....</b>	<b>64</b>
<b>II 1. INTRODUCTION .....</b>	<b>65</b>
<b>II 2. MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>68</b>
<b>II 2.1 CHEMICALS .....</b>	<b>68</b>
<b>II 2.2 SPERMATOZOA SAMPLES PROCESSING AND EXTRATION .....</b>	<b>68</b>
<b>II 2.3 CHOLESTEROL AND PHOSPHATE ANALYSIS .....</b>	<b>69</b>
<b>II 2.4 ANALYSIS OF LIPIDS FROM SPERMATOZOA BY MALDI-TOF MS....</b>	<b>70</b>
<b>II 2.5 STATISTICAL ANALYSIS.....</b>	<b>71</b>
<b>II 3. RESULTS .....</b>	<b>72</b>
<b>II 3.1 CHOLESTEROL CONTENT .....</b>	<b>72</b>
<b>II 3.2 PHOSPHATE CONTENT AND CHOLESTEROL:PHOSPHATE RATIO. ....</b>	<b>72</b>
<b>II 3.3 SCREENING OF LIPIDS FROM SPERMATOZOA OF DOMESTIC CATS .....</b>	<b>73</b>
<b>II 4. DISCUSSION .....</b>	<b>80</b>
<b>II 5. REFERENCES .....</b>	<b>88</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>



## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

FIGURA 1.	Imagem esquemática dos oito estágios do ciclo espermatogênico do epitélio seminífero do gato doméstico. Os estágios I, VI e VII são mostrados subdivididos em a e b. Fonte: BLANCO-RODRIGUEZ, J. 2002 .....	06
FIGURA 2.	Estrutura molecular do colesterol.....	12
FIGURA 3.	Estrutura molecular do fosfolípido tipo colina .....	14
FIGURA 4.	Estrutura molecular da esfingomielina .....	15
FIGURA 5.	Imagem da assimetria da bicamada lipídica encontrada na membrana das células espermáticas. Notar a presença dos diferentes tipos de fosfolípidios predominantes no leito externo, como fosfatidilcolina e glicolípido, e no leito interno, como fosfatidilserina, fosfatidilinositol..	16

### Capítulo II

FIGURE 1.	Positive ion MALDI-TOF mass spectra (matrix 9-Aminoacridin) in the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats. $m/z=482.3$ H <sup>+</sup> - adduct of Lysophosphatidylcholine (LPC, 16:0 alkyl), 496.3/518.3: LPC (16:0), 522.6: LPC (18:1), 524.3/546.3: LPC (18:0).....	74
FIGURE 2.	Positive ion MALDI-TOF mass spectra in the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats. (a) Corresponding to detectable spectra in the matrix 9-Aminoacridin in which peaks at $m/z=650.5$ , 666.5, 678.5 and 694.5 were detected. (b) Corresponding to detectable spectra in the matrix DHB in which only the peak at $m/z=700.6$ was detected. These peaks correspond to oxidation products in the sperm membrane at the samples. More details in Table 1.....	76
FIGURA 3.	Positive ion MALDI-TOF mass spectra (DHB matrix) in the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats. $m/z=772.6/794.6$ H <sup>+</sup> and Na <sup>+</sup> adducts of PC (18:0 alkenyl, 18:1 acyl), $m/z=790.6/812.6$ H <sup>+</sup> and Na <sup>+</sup> adducts of PC (16:0 alkenyl, 22:6 acyl). These peaks correspond to plasmalogens species detectable in the samples.	77
FIGURA 4.	Positive ion MALDI-TOF mass spectra (9-Aminoacridin matrix) in the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats. $m/z=725.6$ : Na <sup>+</sup> adduct of sphingomyelin (16:0),	

758.5/780.5: H<sup>+</sup>- and Na<sup>+</sup> adducts of  
 phosphatidylcholine (PC, 16:0, 18:2), 760.6/782.6:  
 PC (16:0, 18:1), 786.6/808.6: PC (18:0, 18:2),  
 788.6/810.6: PC (18:0, 18:1), 794.6/816.6: PC  
 (16:0 alkyl, 22:5 acyl), 808.5/830.5: PC (16:0, 22:5),  
 810.6/832.6: PC (18:0, 20:4), 836.6/858.6: PC  
 (18:0, 22:5), 841.6: seminolipid..... 79

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

TABELA 1.	Volume testicular, índice gonadossomático (IGS) e dados de avaliação física dos espermatozóides do epidídimo de gatos domésticos, em amostras classificadas como normospérmicas (n= 32) ou teratospérmicas (n= 17).....	43
TABELA 2.	Percentual médio ( $\pm$ EPM) de espermatozóides morfológicamente normais e anormais de gatos domésticos em amostras classificadas como normospérmicas e teratospérmicas.....	44
TABELA 3.	Concentração sérica e intratesticular de testosterona e $17\beta$ -estradiol em amostras de gatos domésticos, classificadas como normospérmicas ou teratospérmicas.....	45
TABELA 4.	Dados morfométricos do testículo de gatos domésticos com amostras normospérmicas (n= 31) e teratospérmicas (n= 16). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.....	47
TABELA 5.	Morfometria das células de Sertoli e de Leydig em testículos de gatos domésticos classificados como normospérmicos ou teratospérmicos, segundo a morfologia dos espermatozóides da cauda do epidídimo (média $\pm$ EPM).....	48
TABELA 6.	Dados histomorfométricos de produção espermática diária e índices de rendimento intrínseco da espermatogênese de gatos domésticos classificados como normospérmicos ou teratospérmicos, segundo a morfologia dos espermatozóides da cauda do epidídimo (média $\pm$ EPM). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.....	48
TABELA 7.	Proporções de células haplóides, diplóides e tetraplóides, transformação espermatogênica total e índice meiótico, obtidos por análise citométrica de testículos de gatos domésticos classificados como normospérmicos ou teratospérmicos, segundo a morfologia dos espermatozóides da cauda do epidídimo (média $\pm$ EPM).....	49

### Capítulo II

TABLE 1.	Assignment of the m/z ratios detected in the positive ion MALDI-TOF mass spectra of the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats collected during the years 2007-2009 .....	78
----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

IUNC	União Internacional para Conservação da Natureza
ER $\beta$	Receptor nuclear para estrogênio subtipo beta
ER $\alpha$	Receptor nuclear para estrogênio subtipo alfa
DPA	Ácido docosapentaenóico
DHA	Ácido docosahexaenóico
PLC	Fosfatidilcolina
PLE	Fosfatidiletanolamina
PLI	Fosfatidilinositol
PLS	Fosfatidilserina
CL	Cardiolipina
SM	Esfingomielina
EP	Plasmalógeno etanolamina
CP	Plasmalógeno colina
PA	Ácido Fosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight
EIA	Enzimaimunoensaio
IM	Intramuscular
PBS	Solução tampão fosfato
GCD	Gota citoplasmática distal
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HRP	Horseradish peroxidase
PED	Produção espermática diária
PI	Iodeto de propídio
IGS	Índice gonadossomático
EPL	Espermatócitos preleptóteno/leptóteno
LPL	Lisofosfolipídios
LPC	Lisofosfatidilcolina
GPC	Glicerofosfatidilcolina
PLP	Fosfolipídios

PLA2      Fosfolipase A2

## RESUMO

A informação disponível sobre a função testicular em felinos é ainda muito limitada, mesmo para o gato doméstico, o qual tem sido utilizado como modelo experimental em estudos que visam a melhoria da reprodução das espécies de felinos ameaçadas de extinção. Deste modo, nosso objetivo foi estudar alguns aspectos ainda inexplorados da fisiologia reprodutiva de felinos, como o balanço entre androgênios e estrogênios intratesticular e suas relações com a espermatogênese e morfologia espermática, além de determinar o perfil lipídico de espermatozóides da cauda de epidídimo de gatos domésticos. Foram realizadas análises da morfologia e de parâmetros físicos de espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo, mensuração das concentrações sérica e intratesticular de testosterona e  $17\beta$ -estradiol, e análise da espermatogênese por morfometria testicular e citometria. Nas análises de lipídios foram quantificados o conteúdo de colesterol e fosfato espermáticos, por meio de teste enzimático-fluorescente e colorimétrico, e rastreamento dos lipídios espermáticos por espectrometria de massa MALDI-TOF. Para o primeiro estudo, foram utilizadas 49 amostras de animais adultos (10 a 96 meses), pesando entre 2,5 e 5,3Kg, apenas durante a primavera/verão. Amostras com percentual de morfologia  $\geq 60\%$  foram classificadas como normospérmicas (N) e as demais teratospérmicas (T). O percentual médio ( $\pm$ EPM) de espermatozóides normais foi  $75,3 \pm 1,9\%$  nas amostras normospérmicas e de  $46,2 \pm 1,6\%$  nas teratospérmicas, as quais apresentaram os maiores percentuais de defeitos primários ( $12,0 \pm 1,5$  vs.  $6,7 \pm 1,0$ ) e secundários ( $41,8 \pm 1,9$  vs.  $18,0 \pm 1,6$ ). A concentração intratesticular de estradiol (ng/g;  $10,2 \pm 1,1$ , N vs.  $16,4 \pm 1,9$ , T) e a proporção intratesticular entre testosterona:estradiol ( $86,0 \pm 10,5$ , N vs.  $45,0 \pm 15,3$ , T) foram diferentes. Na análise morfométrica do testículo não foram observadas diferenças entre os grupos, enquanto na citometria de fluxo, o percentual de células diplóides foi maior no grupo teratospérmico, enquanto o percentual de células haplóides e o índice de transformação espermatogênica total foram maiores no normospérmico. Correlação significativa foi encontrada entre proporção testosterona:estradiol e defeitos primários ( $p=0,51$ ). Para os lipídios de membrana foram analisadas 71 amostras de espermatozóides de epidídimo com um total de  $0,7$  a  $278 \times 10^6$  espermatozóides. O conteúdo médio de colesterol foi  $0,30 \pm 0,21$  nmol/ $10^6$  ( $n= 62$ ), o de fosfato  $1,03 \pm 0,64$  nmol/ $10^6$  ( $n= 24$ ), com uma proporção entre ambos de 0,3. O espectro MALDI-TOF revelou uma grande variabilidade de espécies individuais de lipídios, especialmente de lisofosfatidilcolina (LPC 16:0 alquila, LPC 16:0; LPC 18:0; LPC 22:5; LPC 18:1; LPC 18:2) e de resíduos de ácidos graxos ligados à fosfatidilcolina (16:0; 18:0; 18:1; 18:2; 22:5; 22:6 e 22:4). Também detectou a presença de espécies de peroxidação lipídica (formil-lisofosfatidilcolina, 22:6) e poucas espécies de plasmalógenos (CP alquenila/acila 18:0, 18:1 e 16:0, 22:6). Em conclusão, as concentrações intratesticulares de estradiol e a proporção intratesticular entre testosterona e estradiol foram maiores nos gatos com teratospermia “ocasional” do que nos normospérmicos, sugerindo participação deste desequilíbrio hormonal na gênese da teratospermia e um efeito redutor da eficiência espermatogênica. Ainda, apesar da grande variabilidade de lipídios detectados, as concentrações de colesterol e fosfato são relativamente baixas na membrana dos espermatozóides da cauda do epidídimo de gatos domésticos, em especial, nas amostras teratospérmicas.

**Palavras-chave:** gatos domésticos, estradiol, teratospermia, colesterol, fosfolipídios.

## ABSTRACT

The available information on testicular function in cats is still very limited, even for the domestic cat, which has been used as experimental model in studies aimed at improving the reproduction of the feline species threatened with extinction. Thus, our objective was to study some aspects still unexplored in reproductive physiology of cats, as the balance between intratesticular androgens and estrogens and their relationships with spermatogenesis and morphology, and to determine the lipid profile of sperm tail of the epididymis of domestic cats. We analyzed the morphology and physical parameters of sperm obtained from epididymal cauda, measurement of serum and intratesticular concentrations of testosterone and  $17\beta$ -estradiol, and analysis of spermatogenesis by testicular morphometry and cytometry. In the analysis of lipids were measured cholesterol content and phosphate sperm by means of enzyme assay and fluorescent-colorimetric, and tracking of sperm lipids by mass spectrometry MALDI-TOF. For the first study, we used 49 samples of adult animals (10-96 months), weighing between 2.5 and 5.3kg, only during spring / summer. Morphology percentage of samples with  $\geq 60\%$  were classified as normospermicas (N) and other teratospermia (T). The average ( $\pm$  SEM) of normal spermatozoa was  $75.3 \pm 1.9\%$  in samples normospermicas and  $46.2 \pm 1.6\%$  in teratospermia, which had the highest percentage of primary defects ( $12.0 \pm 1$ , v.  $5.6.7 \pm 1.0$ ) and secondary ( $41.8 \pm 1.9$  vs.  $18.0 \pm 1.6$ ). The intratesticular concentration of oestradiol (ng/g,  $10.2 \pm 1.1$ , N vs.  $16.4 \pm 1.9$ , T) and the ratio between intratesticular testosterone:estradiol ( $86.0 \pm 10.5$ , N vs.  $45.0 \pm 15.3$ , T) were different. The morphometry of the testis there were no differences between groups, while in flow cytometry, the percentage of diploid cells was higher in group teratospermia, while the percentage of haploid cells and spermatogenic transformation index were higher in total normospermico. Significant correlation was found between proportion testosterone: estradiol and primary defects ( $p = 0.51$ ). For the membrane lipids were analyzed 71 samples of sperm from the epididymis with a total 0.7 to  $278 \times 10^6$  sperm. The average content of cholesterol was  $0.30 \pm 0.21$  nmol/10<sup>6</sup> ( $n = 62$ ), the phosphate  $1.03 \pm 0.64$  nmol/10<sup>6</sup> ( $n = 24$ ), with a ratio of 0.3 both. The MALDI-TOF spectrum revealed a great variability of individual species of lipids, especially lysophosphatidylcholine (LPC 16:0 alkyl, LPC 16:0, LPC 18:0, LPC 22:5, LPC 18:1, LPC 18:2) and fatty acid residues linked to phosphatidylcholine (16:0, 18:0, 18:1, 18:2, 22:5, 22:6 and 22:4). Also detected the presence of species of lipid peroxidation (formyl-lysophosphatidylcholine, 22:6) and few species of plasmalogen (CP alkenyl / acyl 18:0, 18:1 and 16:0, 22:6). In conclusion, the intratesticular concentrations of oestradiol and the ratio between intratesticular testosterone and estradiol were higher in cats with teratospermia "casual" than in normospermicos, suggesting involvement of this hormonal imbalance in the genesis of teratospermia and lowering effect spermatogenic efficiency. Still, despite the great variability of lipids detected, the concentrations of cholesterol and sodium phosphate are relatively low in the membrane of the sperm tail of the epididymis of domestic cats, particularly in samples teratospermia.

**Key-words:** domestic cats, estradiol, teratospermy, cholesterol, phospholipids.



## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **1 REPRODUÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE FELINOS**

A família *Felidae* é representada por 37 espécies de felinos atualmente encontrados na natureza e, segundo a lista de gatos ameaçados da IUCN (2009), 36 destas espécies enfrentam desafios que os colocam em grau mais ou menos crítico de ameaça à extinção. Enquanto a perda de habitat permanece como o desafio primário de ameaça a estes mamíferos, outros são desproporcionalmente ameaçados pela superexploração, como a caça predatória para o comércio de peles e filhotes (MORAIS *et al.*, 2002; NOWELL, 2009). Por este motivo, especialistas da área têm realizado inúmeras pesquisas no intuito de aprimorar as técnicas de reprodução em cativeiro, como a criopreservação de sêmen, a inseminação artificial e a transferência de embrião; compreender melhor a fisiologia reprodutiva dos felinos, já que pouca informação sobre a função testicular, espermatogênese e espermiogênese tem sido disponibilizada até então para felinos, incluindo o próprio gato doméstico (PUKAZHENTHI *et al.*, 2006) e ainda solucionar os problemas que inviabilizam o sucesso da reprodução em cativeiro (MORAIS *et al.*, 1996; MORAIS; MUCCILO, 1997; MORAIS, 2001; MORAIS *et al.*, 2002, BONAMIGO *et al.*, 2002; LUVONI, 2006; BAUDI *et al.*, 2008; FUCHS *et al.*, 2009).

Dentro deste contexto, a criopreservação de espermatozóides tem sido utilizada em várias espécies domésticas para aumentar a eficácia do cruzamento entre animais e tem sido considerada como uma ferramenta extremamente importante para a preservação de material genético de espécies de felinos que se encontram de alguma forma ameaçadas ou em risco de extinção (AXNÉR *et al.*, 2004; LUVONI, 2006). Porém, apesar dos esforços de vários pesquisadores da área e de alguns resultados encorajadores, a motilidade e a integridade acrossomal continuam sendo grandemente afetadas pelos procedimentos de congelamento e descongelamento do sêmen (LUVONI *et al.*, 2003a). Os resultados obtidos até o momento pelos vários laboratórios são ainda muito variáveis, tornando essencial a busca de um protocolo ideal de criopreservação (AXNÉR, 2006; HOWARD *et al.*,

1986; HAY; GODROOWE, 1993; LUVONI *et al.*, 2003b; TSUTSUI *et al.*, 2003; ZAMBELLI *et al.*, 2002).

Os danos ocasionados à integridade física e funcional das células espermáticas durante a criopreservação afetam sua capacidade de fertilização e resultam tanto das mudanças de temperatura quanto das alterações osmóticas durante os processos de resfriamento, congelamento e descongelamento (LUVONI *et al.*, 2003a). Os mecanismos pelos quais o estresse térmico e osmótico danifica a integridade da célula espermática não são totalmente entendidos, porém, sabe-se que estão relacionados com a composição lipídica da membrana espermática (Watson, 1995 *apud* LUVONI *et al.*, 2003b).

Além disso, muitos outros estudos têm sido direcionados para um fator de grande relevância na reprodução de felinos, que é a compreensão dos mecanismos que levam à teratospermia, condição em que mais de 60% dos espermatozóides presentes no ejaculado apresentam anomalias morfológicas (HOWARD *et al.*, 1986; 1990; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; 2002). A teratospermia afeta gatos domésticos e felinos selvagens, sendo que vinte e oito espécies da família dos felinos são classificadas como teratospérmicos (HOWARD *et al.*, 1986; WILDT, 1994). As causas da teratospermia ainda permanecem desconhecidas, entretanto, fatores genéticos e ambientais provavelmente podem interferir na regulação da proporção de espermatozóides morfolologicamente normais (LINDBURG *et al.*, 1993). O decréscimo na variabilidade genética em algumas populações de espécies felinas isoladas tem sido associado ao grande número de espermatozóides morfolologicamente anormais no ejaculado (WILDT *et al.*, 1987), assim como os baixos níveis de testosterona sérica (HOWARD *et al.*, 1990). Três exemplos clássicos dessa perda de variabilidade genética associada a altos índices de teratospermia são descritos para machos de guepardo (*Acinonyx jubatus*), de leão Asiático e de puma da Flórida, os quais apresentam de 70 a 90% de formas anormais no ejaculado (WILDT *et al.*, 1983; 1987; ROELKE *et al.*, 1993; PUKAZHENTHI *et al.*, 2001). Entretanto, mesmo populações não consanguíneas como machos de tigrina (gato do mato pequeno) (MORAIS, 2000) e lince (*Lynx lynx*) (GÖRITZ *et al.*, 2006) também apresentam indivíduos teratospérmicos. Isto sugere que fatores genéticos, outros que não àqueles ligados à consanguinidade e fatores externos como estresse, dieta e condições subótimas de manejo em cativeiro

possam estar envolvidos na origem da teratospermia nesses animais (LINDBURG *et al.*, 1993).

Além disso, não somente fatores ambientais, mas também fatores inerentes ao testículo em si, como as concentrações intratesticulares de hormônios androgênicos e estrogênicos e a proporção entre estes mesmos hormônios no testículo, também podem estar relacionados com a produção de formas espermáticas morfollogicamente anormais ou mesmo com a etiologia da teratospermia, conforme sugerido em humanos (ZHANG *et al.*, 2010). Neste contexto, sabe-se que a testosterona é imprescindível para o início e manutenção da espermatogênese e o estradiol parece ter um papel fundamental na regulação da espermatogênese (O'DONNELL *et al.*, 2001) e na absorção de fluido nos ductos eferentes e no epidídimo (HESS *et al.*, 1997ab; FISHER *et al.*, 1998), uma função importante para o aumento da concentração espermática e para a aquisição, pelos espermatozoides, das suas propriedades móveis, morfológicas e bioquímicas durante passagem através do epidídimo (HESS *et al.*, 1997b; CARREAU *et al.*, 1999; HESS, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2001). Porém, até o presente momento, não existem dados na literatura sobre a relação entre teratospermia e alterações no balanço entre androgênicos e estrogênicos sobre felinos.

A teratospermia representa um grande entrave para os programas de conservação de espécies de felinos ameaçados de extinção que se utilizam de tecnologias de reprodução assistida como a manipulação genética, uma vez que os espermatozoides de doadores teratospérmicos são mais susceptíveis ao dano acrossomal induzido pela criopreservação (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999) e mesmo espermatozoides morfollogicamente normais provenientes destes animais podem apresentar vários defeitos estruturais e funcionais (PUKAZHENTHI *et al.*, 2001), que resultam em perda da capacidade de fecundação e dificultam o sucesso da reprodução destes animais em cativeiro. É possível que parte destas alterações funcionais esteja relacionada a diferenças na composição da membrana dos espermatozoides nessas populações, já que, por exemplo, a composição lipídica, bem como as várias transformações sofridas pela mesma nos diversos estágios de preparação do gameta masculino para a fertilização é determinante para o sucesso na interação com o gameta feminino e na criopreservação espermática.

A teratospermia representa um grande entrave para os programas de conservação de espécies de felinos ameaçados de extinção que se utilizam de

tecnologias de reprodução assistida como a manipulação genética, uma vez que os espermatozóides de doadores teratospérmicos são mais susceptíveis ao dano acrossomal induzido pela criopreservação (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999) e mesmo espermatozóides morfollogicamente normais provenientes destes animais podem apresentar vários defeitos estruturais e funcionais (PUKAZHENTHI *et al.*, 2001), que resultam em perda da capacidade de fecundação e dificultam o sucesso da reprodução destes animais em cativeiro. É possível que parte destas alterações funcionais esteja relacionada a diferenças na composição da membrana dos espermatozóides nessas populações, já que, por exemplo, a composição lipídica, bem como as várias transformações sofridas pela mesma nos diversos estágios de preparação do gameta masculino para a fertilização é determinante para o sucesso na interação com o gameta feminino e na criopreservação espermática.

## **2 ESPERMATOGÊNESE E ESTEROIDOGÊNESE NO GATO DOMÉSTICO**

### **2.1 ESPERMATOGÊNESE**

O gato doméstico tem servido como um modelo comparativo para as espécies ameaçadas (FARSTAD, 2000; LUVONI *et al.*, 2003a), na maioria dos estudos reprodutivos em felinos, uma vez que aspectos éticos, legais e riscos à vida dos animais limitam a realização de pesquisas em espécimes selvagens (LUVONI *et al.*, 2003a). Além disso, o gato doméstico tem sido utilizado como modelo para o estudo de desordens genéticas e reprodutivas em humanos (FARSTAD, 2000; LUVONI *et al.*, 2003a) como a teratospermia, uma importante causa de infertilidade no homem (Bhasin *apud* PUKAZHENTHI *et al.*, 2006). A possibilidade de obtenção de filhotes de raças de grande valor comercial também estimula o uso das técnicas de reprodução assistida em felinos (FARSTAD, 2000; LUVONI *et al.*, 2003a) como, por exemplo, a criopreservação de gametas (LUVONI *et al.*, 2003b). Somado a isso, é mais viável utilizar o gato doméstico para estudar a função testicular em experimentos que envolvam a orquiectomia (NEUBAUER *et al.*, 2004), já que nos

espécimes selvagens tem sido utilizada, alternativamente, a biopsia testicular (LEITE *et al.*, 2005).

A gônada masculina dos felinos, assim como de outros mamíferos, é caracterizada como um órgão altamente complexo, formado por dois compartimentos, nos quais são desempenhadas as suas principais funções: espermatogênese e síntese de hormônios esteróides (CARREAU, 1994). Esses dois compartimentos são compostos por importantes tipos celulares: nos túbulos seminíferos são encontradas as células germinativas e as células de Sertoli, enquanto no espaço intersticial estão as células de Leydig (HESS *et al.*, 1995).

As células de Sertoli são responsáveis pela sustentação das células germinativas, mediante produção de hormônios, fatores reguladores e de nutrientes (GRISWOLD, 1995; O'DONNELL *et al.*, 2001). O desenvolvimento destas últimas células, como se sabe, é um processo regulado por meio de precisas interações parácrinas entre grupos desses dois tipos celulares, as quais são imprescindíveis para a espermatogênese (GRISWOLD, 1995). A relação existente entre esses dois tipos celulares no testículo, pelo seu estreito contato e localização, é organizada em um ciclo de desenvolvimento específico denominado ciclo do epitélio seminífero (GRISWOLD, 1995; O'DONNELL *et al.*, 2001).

A espermatogênese caracteriza-se por um processo cíclico, altamente complexo, coordenado em uma série de divisões celulares e maturação celular, no qual uma espermatogônia dará origem a espermatozóides (KERR, 1989; O'DONNELL *et al.*, 2001; FRANÇA; GODINHO, 2003). Esse processo é determinado geneticamente (FRANÇA *et al.*, 1998) e se divide em três fases principais: proliferativa, de meiose e de diferenciação (FOSTER, 1988; GARNER; HAFEZ, 1988; BRINSKO, 1999). Durante esse processo, diferentes associações celulares são formadas, denominadas de estágios, os quais são identificados conforme a alteração na forma do núcleo das espermátides, a ocorrência de divisão meiótica e o arranjo das espermátides dentro do epitélio germinativo (BERNDTSON, 1977; O'DONNELL *et al.*, 2001). A identificação também pode ser feita levando-se em consideração o desenvolvimento do acrossoma e a morfologia das espermátides (Leblond; Clermont, 1952 *apud* FRANÇA; GODINHO, 2003). Estudos de histomorfometria testicular demonstraram que em gatos domésticos e pumas existem oito estágios (FIGURA 1) no epitélio dos túbulos seminíferos e que nessas

espécies, a espermatogênese se completa em 48,6 e 44,5 dias, respectivamente (FRANÇA; GODINHO, 2003; LEITE *et al.*, 2005).

Os primeiros trabalhos focados no estudo da espermatogênese em felinos foram realizados em gatos domésticos. O aparecimento dos espermatozoides no testículo ocorreu somente a partir dos cinco meses de idade em 23,8% dos animais avaliados. Na cauda do epidídimo, os espermatozoides foram observados aos seis meses de idade em 46,9% dos animais e aos sete meses em 80,8%. Somente aos oito meses, as células espermáticas foram observadas em 100% dos indivíduos (TSUTSUI *et al.*, 2004). A produção diária de espermatozoides por testículo é de cerca de 16 milhões e a porcentagem de perda celular durante esse processo, denominado índice de apoptose, é de 30% (FRANÇA; GODINHO, 2003).

#### Estágios do ciclo espermatogênico do gato doméstico

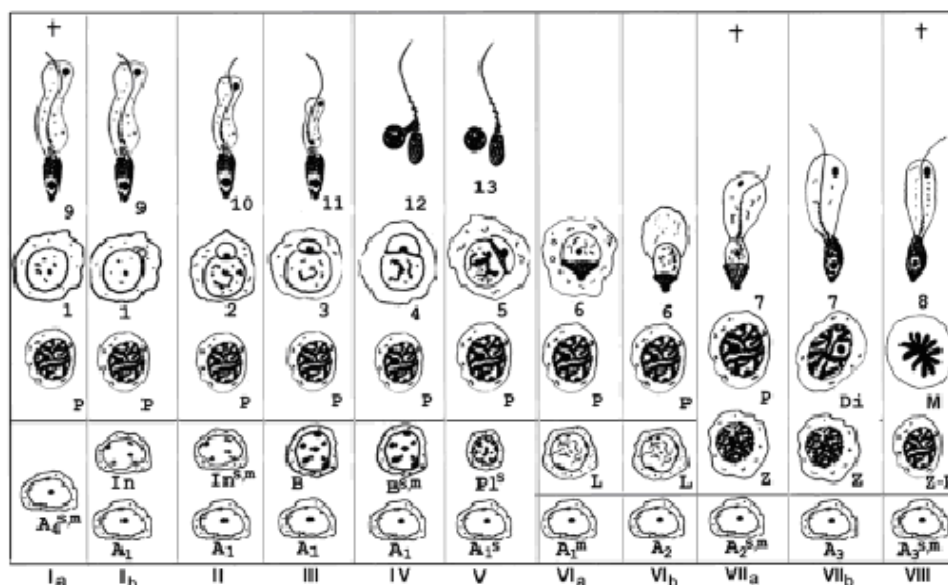


FIGURA 1. Imagem esquemática dos oito estágios do ciclo espermatogênico do epitélio seminífero do gato doméstico. Os estágios I, VI e VII são mostrados subdivididos em a e b. Fonte: BLANCO-RODRIGUEZ, J. 2002.

Nesse contexto, Neubauer *et al.* (2004) verificaram mediante histomorfometria testicular e análise citométrica que, em comparação com indivíduos

normospérmicos, a espermatogênese nos gatos teratospérmicos é mais eficiente, com uma produção de espermatozóides 177% maior. Esta maior quantidade de espermatozóides é decorrente da maior quantidade de tecido produtor de espermatozóides e de células germinativas por células de Sertoli, associada a um menor índice apoptótico durante a espermatogênese. Nas análises de citometria de fluxo, observou-se que indivíduos teratospérmicos continham maiores proporções de células haplóides, maior índice de transformação espermiática e maior índice meiótico. Além disso, a relação entre o número de células germinativas por célula de Sertoli é consistentemente maior nos indivíduos teratospérmicos (13,7% vs. 19,4%) e os túbulos seminíferos desses últimos contêm 100% a mais células germinativas por célula de Sertoli do que aqueles dos indivíduos normospérmicos (12,8% vs. 24,7%). Entretanto, essa maior produção espermiática, por mecanismos ainda não identificados, é obtida em detrimento da qualidade, levando ao aparecimento de uma alta proporção de células morfológicamente defeituosas.

## 2.2 ESTEROIDOGENESE TESTICULAR

No testículo adulto de mamíferos, as células de Leydig são responsáveis pela produção dos hormônios, testosterona e estradiol (ABNEY, 1999; O'DONNELL *et al.*, 2001). A testosterona e demais hormônios androgênicos são essenciais para a ocorrência da espermatogênese e manutenção das funções sexuais secundárias. Ela é necessária durante a diferenciação sexual e para o início da espermatogênese (ROMMERTS, 1988; CARREAU *et al.*, 2004), assim como para a manutenção e funcionamento dos órgãos sexuais acessórios e características sexuais secundárias (RISBRIDGER; KRETZER, 1989). Juntamente com as gonadotropinas e moduladores intratesticulares, a testosterona é responsável também pela manutenção da espermatogênese (CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU, 2001; CARREAU *et al.*, 2002; CARREAU *et al.*, 2004). Os seus efeitos nesse processo são muito específicos e ocorrem em alguns estágios do desenvolvimento das células germinativas (RUSSELL *et al.*, 1986; SHARPE *et al.*, 1990; SHARPE, 1990). A conversão de espermatídes arredondadas em espermatídes alongadas ocorre nos estágios VII e VIII e esta diferenciação é atribuída à testosterona, sendo estes

estágios considerados dependentes de testosterona (O'DONNELL *et al.*, 1994). Além disso, a testosterona pode ter efeitos indiretos sobre a espermatogênese, como, por exemplo, o seu papel modulador sobre o fluxo sanguíneo testicular (RISBRIDGER; KRETZER, 1989; SHARPE, 1990).

Parte da testosterona testicular difunde-se para a circulação sistêmica gerando concentrações plasmáticas bastante variáveis. Por exemplo, a concentração plasmática de testosterona em felinos pode variar desde valores não detectáveis (< 0,02 ng/mL) até 18,2 ng/mL em gatos domésticos normais adultos (KIRKPATRICK, 1985; JOHNSTON *et al.*, 1996). Uma maior concentração média de testosterona sérica (1,2 ng/mL) foi observada em gatos domésticos normospermicos em comparação com animais teratospermicos (0,4 ng/mL) (HOWARD *et al.*, 1990). Em estudo mais recente, entretanto, não foram obtidas diferenças significativas nos níveis de testosterona intratesticular entre animais teratospermicos (893 ng/g de testículo) normospermicos (1239 ng/g de testículo; NEUBAUER *et al.*, 2004).

Outros esteróides produzidos pelos testículos são os estrogênios, para os quais apenas recentemente foram obtidas as primeiras evidências sobre a existência de seu papel na regulação da espermatogênese (O'DONNELL *et al.*, 2001). O estrogênio sempre foi considerado como um hormônio essencialmente feminino, mesmo tendo sido documentada sua presença na gônada masculina há mais de 50 anos (ZONDEK, 1934; LEACH *et al.*, 1956; CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU, 2001). A biossíntese dos estrogênios a partir dos androgênios é catalisada pela enzima aromatase P450 (CARREAU *et al.*, 2002), que tem sido imunolocalizada, principalmente nas células de Leydig na maioria dos testículos de mamíferos. Em ratos, esta imunolocalização apresenta um padrão idade-dependente, tendo sido a atividade da aromatase, nos animais imaturos, detectada nas células de Sertoli e nos animais maduros, nas células de Leydig. Entretanto, nos suínos, carneiros e mesmo no homem, a atividade da aromatase foi encontrada unicamente nas células de Leydig (CARREAU *et al.*, 1999). Além disso, as células germinativas também expressam RNA mensageiro (RNAm) da aromatase P450, a qual é transcrita em uma enzima biologicamente ativa, envolvida na produção de estrogênios (CARREAU *et al.*, 2002). Neste contexto, a expressão do RNAm da aromatase P450 também detectada nos espermatozoides humanos, mostra que não somente as células somáticas e as células germinativas são aptas a sintetizar



estrogênios, mas as células espermáticas podem também ser uma fonte de síntese de estrogênios (CARREAU, 2001; O'DONNELL *et al.*, 2001).

Muitas pesquisas têm sido atualmente realizadas na tentativa de esclarecer a função destes hormônios na espermatogênese. Sabe-se que o estrogênio atua por meio de receptores nucleares (ER), capazes de modular a transcrição de genes específicos envolvidos no crescimento, função e diferenciação celular (CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU *et al.*, 2002). Por mais de 10 anos sabia-se apenas da existência de um único receptor (ER $\alpha$ ) até a descoberta do tipo beta (ER $\beta$ ), em 1996 (KUIPER *et al.*, 1996). Como a distribuição desses dois receptores é diferente nos diversos tecidos, os efeitos do estrogênio no trato genital masculino foram reavaliados. O ER $\alpha$  foi encontrado em tecidos do trato genital masculino de vários mamíferos como seres humanos, macacos, ratos, coelhos, camundongos, galos, bodes, cães e gatos domésticos (DANZO; ELLER, 1979; IGUSHI *et al.*, 1991; GOYAL *et al.*, 1997; HESS *et al.*, 1997a; KWON *et al.*, 1997; SAUNDERS *et al.*, 2001; NIE *et al.*, 2002; SCHÖN *et al.*, 2009). Já, o ER $\beta$  foi constatado em seres humanos, macacos, ratos, camundongos, cães e gatos (HESS *et al.*, 1997a; ROSENFELD *et al.*, 1998; JEFFERSON *et al.*, 2000; SAUNDERS *et al.*, 2001; NIE *et al.*, 2002; SCHÖN *et al.*, 2009). Em ratos *Knock-out* ER $\alpha$  e *Knock-out* ER $\beta$  verificou-se que esses animais eram inférteis na ausência do primeiro receptor (LUBAHN *et al.*, 1993), mas não na ausência do segundo (KREGGE *et al.*, 1998).

Nos gatos domésticos, o ER $\beta$  foi encontrado na maioria das células germinativas, células de Sertoli, células peritubulares e células de Leydig no testículo, assim como nos ductos eferentes, epidídimo e deferente (NIE *et al.*, 2002; SCHÖN *et al.*, 2009). Nas células germinativas, além da presença desses receptores, ainda foi constatada a síntese de estrogênios, o que sugere um papel importante desses hormônios no desenvolvimento desses tipos celulares e na espermatogênese como um todo (CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU *et al.*, 2004). Já o ER $\alpha$  foi encontrado nas células peritubulares, ductos eferentes, áreas seletivas do epidídimo e ducto deferente (NIE *et al.*, 2002; SCHÖN *et al.*, 2009). D'Souza *et al.* (2005) demonstrou que, em ratos machos, os estrogênios, além de efeito inibitório sobre a biossíntese de testosterona pelas células de Leydig no testículo, também apresentam efeito anti-apoptótico direto nas células germinativas.

Os estrógenos também estão envolvidos na regulação da absorção de fluido nos ductos eferentes (HESS *et al.*, 1997a) e nas regiões proximais do epidídimo de ratos e macacos mediante modulação da expressão de canais de membrana (aquaporina-1) (FISHER *et al.*, 1998). Conforme demonstrado em camundongos geneticamente modificados, sem o gene para ER $\alpha$  (*Knock-out* ER $\alpha$ ), a não reabsorção do fluido epididimário leva ao seu acúmulo dentro dos túbulos seminíferos e o consequente aumento da pressão intratubular acaba resultando na destruição das células germinativas e na infertilidade. O processo de reabsorção de fluidos é importante para aumentar a concentração de espermatozóides e permitir o alcance de várias propriedades móveis, morfológicas e bioquímicas durante sua passagem através do epidídimo, garantindo sua completa capacidade de fertilização (HESS *et al.*, 1997ab; CARREAU *et al.*, 1999; HESS, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2001). Em camundongos *knockout* ER $\alpha$  verificou-se que o peso testicular aumenta durante o desenvolvimento pós-puberdade, devido ao acúmulo de fluido no lúmen dos túbulos seminíferos, sugerindo um excesso de produção de fluido secretado pelos testículos e/ou uma falha na reabsorção pelos ductos eferentes (HESS *et al.*, 1997a).

A presença e distribuição dos receptores para estrogênios nas células testiculares demonstram a presença desses hormônios no testículo e, acredita-se que altas concentrações de estradiol estejam presentes no mesmo, uma vez que concentrações de cerca de 10 a 50 vezes maiores de estradiol já foram demonstradas no fluxo venoso espermático, comparada com aquelas do sangue em várias espécies (KELCH *et al.*, 1972). No rato, o fluido da *rete testis* tem uma concentração de estrogênio próxima de 250pg/mL, o que é relativamente alta comparada ao nível sérico (FREE; JAFFE, 1979; HESS, 2000). Em ovinos adultos, a concentração média de estradiol no fluxo venoso testicular foi positivamente correlacionada com a produção diária de espermatócitos primários no estágio leptóteno por testículo (CARZOLA *et al.*, 1998). Este achado corrobora com os resultados de outros estudos que demonstraram que os estrógenos apresentam um importante papel tanto na espermatogênese quanto na espermiogênese em macacos (SHETTY *et al.*, 1997). Os estrógenos não somente regulam o desenvolvimento das células de Leydig, mas também são capazes de influenciar a esteroidogênese nessas células em animais adultos, assim como em humanos (ABNEY, 1999). Além disso, o número de células germinativas primordiais e a

maturação das espermátides nos túbulos seminíferos parecem ser regulados pelos estrógenos (ações parácrina e/ou autócrina) (CARREAU, 2001). Neste contexto, estudos *in vitro* demonstraram que o número de gonócitos em ratos é controlado por fatores de crescimento e pelo estradiol e, conforme evidenciado em camundongos *Knockout* ER, os estrógenos são necessários para alcançar a fertilidade. Esses fatores, por sua vez, podem explicar, ao menos em parte, as ações dos estrógenos nas células germinativas masculinas (CARREAU *et al.*, 2002).

No que se refere ao epidídimo, tem sido sugerido também que o transporte dos espermatozóides através do epidídimo seja controlado pelos estrógenos e, é possível que esses hormônios estejam envolvidos não somente na produção, mas também na maturação e transporte de espermatozóides (MEISTRICH *et al.*, 1975; TSUTSUMI *et al.*, 1987; CARREAU *et al.*, 1999). Somado a isso, a alta concentração de estradiol na cauda do epidídimo e ducto deferente corrobora com um possível papel para os estrógenos no transporte dos espermatozóides (CARREAU *et al.*, 1999).

Com base em todos esses dados obtidos até o momento sobre as supostas ações dos estrogênios na espermatogênese e na esteroidogênese nos mamíferos, é possível especular que a disfunção testicular verificada em gatos domésticos teratospérmicos e, até mesmo em felinos selvagens, esteja de algum modo relacionada a alguma alteração nas concentrações de estrogênios sérico e/ou intratesticular nesses animais e nas proporções sérica e intratesticular entre testosterona e estradiol. Entretanto, essa hipótese ainda permanece para ser testada.

### **3 COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA**

Os lipídios de membrana são conhecidos por seus efeitos sobre as propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, propriedades funcionais características dos espermatozóides (GRIZARD *et al.*, 2000). Sabe-se, por exemplo, que o colesterol (Figura 2) é capaz de modular a fluidez, a permeabilidade e a mobilidade lateral de proteínas integrais da membrana, conferindo estabilidade à mesma e, ainda, desempenhar um importante papel no processo de capacitação

espermática (MATINEZ; MORROS, 1996; LENZI *et al.*, 2000; APEL-PAZ *et al.*, 2003; DE ROBERTS *et al.*, 2003). A constituição lipídica da membrana também determina a temperatura de transição de fase líquida para gel, o que influencia na motilidade, na exocitose acrossomal e nas propriedades fusogênicas dos espermatozóides (JONES, 1998; GRIZARD *et al.*, 2000; DE ROBERTS *et al.*, 2003), assim como nos eventos de resistência aos processos de congelamento e descongelamento do sêmen (PARKS; LYNCH, 1992; GRIZARD *et al.*, 2000; Pettitt MJ; Buhr MM 1998 *apud* CEROLINI *et al.*, 2001; PURDY; GRAHAM, 2004). Exemplos disso são o conteúdo de plasmalógenos, que com frequência está negativamente correlacionado com a extensão do dano celular resultante do processo de congelamento (Mann-Lutwack *apud* LESSIG *et al.*, 2004), e a proporção entre colesterol e fosfolipídios, que quanto maior, maior a resistência dos espermatozóides de mamíferos ao choque frio (DARIN-BENNETT *et al.*, 1973). Conforme Drobnis *et al.* (1993), o alto conteúdo de colesterol presente na membrana dos espermatozóides de seres humanos parece ser responsável por uma membrana mais estável durante o resfriamento.

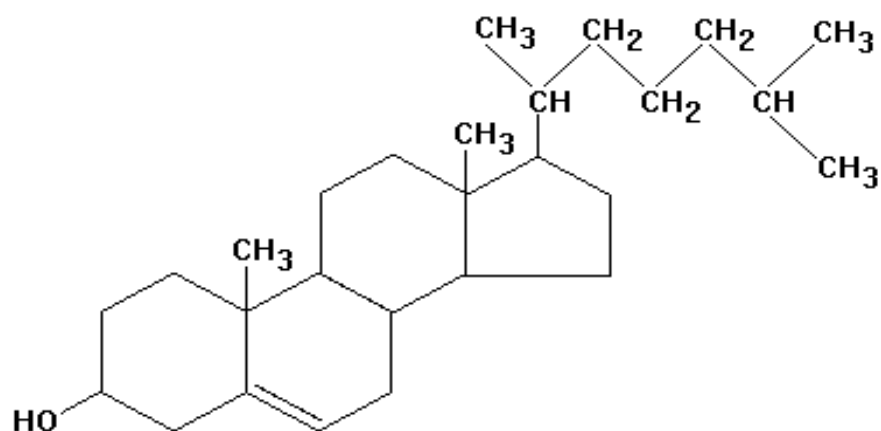


FIGURA 2. Estrutura molecular do colesterol.

Adicionalmente, a susceptibilidade dos espermatozóides de mamíferos ao dano induzido pela criopreservação parece estar relacionada à alta proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados, somado ao baixo conteúdo de

colesterol da membrana (WHITE, 1993). No estudo realizado por Miller Jr *et al.* (2005), verificou-se que o maior nível de ácido docosapentaenóico (DPA), a maior proporção entre ácidos graxos saturados e insaturados e os maiores níveis de desmosterol e colesterol na membrana espermática da raposa prata estão relacionados com maior percentual de células vivas após criopreservação de espermatozóides e nas taxas aceitáveis de fertilização por inseminação artificial com espermatozóides descongelados nesta espécie. Em seres humanos, a motilidade espermática pós-descongelamento foi fortemente correlacionada com o nível de ácido docosahexaenóico (DHA) na membrana espermática ( $r=0,82$ ;  $p<0,001$ ; GULAYA *et al.*, 2001) e a viabilidade espermática teve correlação positiva com os níveis de ácido docosahexaenóico e ácido docosapentaenóico (MILLER JR *et al.*, 2005). Também foi verificada correlação positiva entre ácido docosahexaenóico (DHA) e a motilidade e a concentração espermáticas e espermatozóides morfológicamente normais, assim como correlação positiva entre ácido graxo poliinsaturado e concentração e morfologia espermáticas normais (AKSOY *et al.*, 2006). Em macacos, maior porcentagem de células móveis e maiores valores de motilidade progressiva foram observadas em uma suspensão de sêmen fresco com maiores proporções entre desmosterol e colesterol (CONNOR *et al.*, 1998).

A constituição lipídica da membrana espermática tem sua origem nas espermatogônias e é consideravelmente modificada durante a espermiogênese e maturação epididimária, só se completando durante o processo de capacitação (JONES, 1998; JAMES *et al.*, 1999). Estas modificações permitem que os espermatozóides passem de um estado infértil e imóvel para o de uma célula vigorosamente ativa, apta a se ligar de modo específico e se fundir com o ovócito (JONES, 1998; JAMES *et al.*, 1999; AXNÉR, 2006; JONES *et al.*, 2007).

Conforme os espermatozóides maturam, o conteúdo de fosfolípidios diminui substancialmente, cerca de 29% até 46% no carneiro (SCOTT *et al.*, 1967; PARKS; HAMMERSTED, 1985), 33% no caprino (RANA *et al.*, 1991), 50% no touro (POULOS *et al.*, 1973) e 54% no rato (AVELDANO *et al.*, 1992), quando são comparados os conteúdos de lipídios da membrana de espermatozóides obtidos do testículo com aqueles da cabeça e da cauda do epidídimo.

O decréscimo no conteúdo de lipídios entre os espermatozóides do testículo e da cauda do epidídimo é um tanto similar para as espécies estudadas. Por exemplo, no carneiro foi verificada uma redução de fosfatidilcolina (PLC) (Figura

3) de 37%, fosfatidiletanolamina (PLE) 45%, fosfatidilinositol (PLI) 79%, fosfatidilserina (PLS) 78%, cardiolipina (CL) 35%, esfingomielina (SM) (Figura 4) 17%, plasmalógeno etanolamina (EP) 61% e plasmalógeno colina (CP) 9% (SCOTT *et al.*, 1967). Como exceção, entretanto, tem-se os suínos, espécie na qual não foi observada significativa redução no conteúdo de fosfolipídios e esteróis da membrana entre os espermatozóides do testículo e da cauda do epidídimo (Nikolopoulou *apud* JAMES *et al.*, 1999).

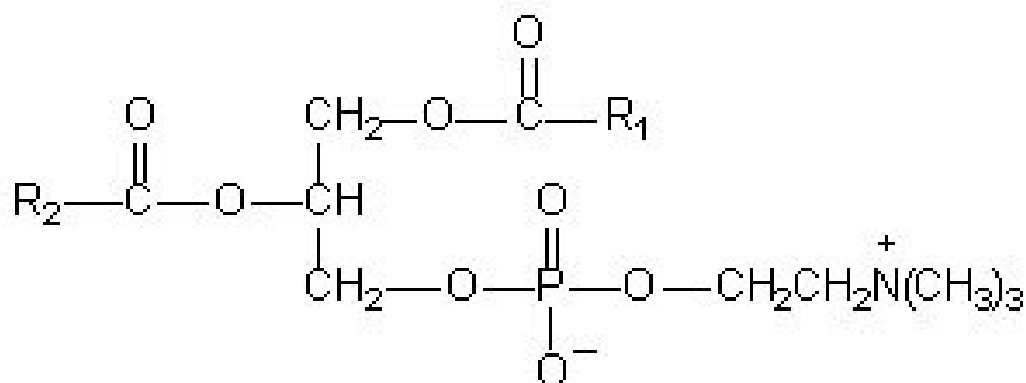


FIGURA 3. Estrutura molecular do fosfolipídio tipo colina.

Essa modificação na composição lipídica também foi observada entre as células germinativas matura e imatura e se estende ao tipo de resíduo de ácido graxo. Lenzi *et al.* (2000), demonstraram que o ácido docosahexanóico (DHA) é o ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa predominante das células maduras, enquanto nas imaturas a porcentagem de ácidos graxos saturados e dos ácidos graxos linoléico e linolênico é significativamente maior. Esses dados mostram que a perda de fosfolipídios da membrana durante a maturação epididimária é altamente seletiva e variável entre as diferentes espécies de mamíferos (PARKS; HAMMERSTED, 1985; RANA *et al.*, 1991; JAMES *et al.*, 1999).

Neste contexto, a constituição lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides mamíferos, além de ser espécie-específica, também varia consideravelmente entre espécies e mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, uma vez que diferenças sazonais, dietéticas e de faixa etária são

consideradas fatores capazes de produzir modificações nesta constituição (EVANS; STECHELL, 1979). Segundo Rooke *et al.* (2001), a suplementação alimentar de suínos com óleo de atum resultou em aumento dos níveis de ácido docosahexanóico (DHA) na membrana espermática, o que melhorou a motilidade espermática e reduziu as proporções de espermatozóides anormalmente formados. Porém, a suplementação da dieta de coelhos com o DHA não afetou sobremaneira a qualidade e composição lipídica da membrana (GLIOZZI *et al.*, 2009).

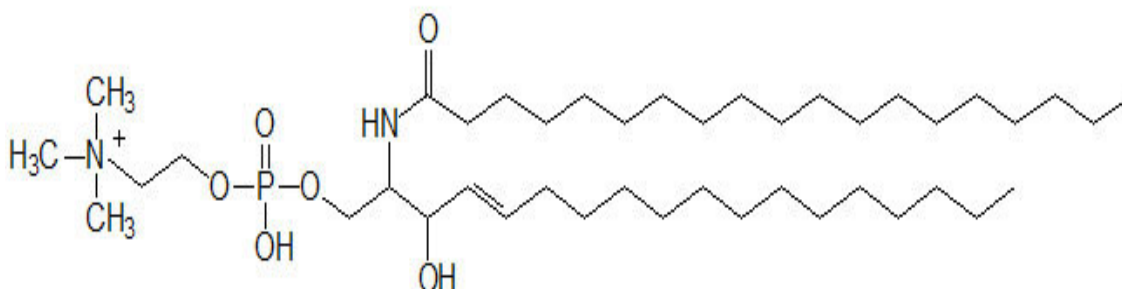


FIGURA 4. Estrutura molecular da esfingomielina.

Apesar de haver, considerável diferença entre as espécies de mamíferos na composição da membrana do espermatozóide maturo, de um modo geral, a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (Mann; Mann-Lutwak *apud* FLESCHE; GADELLA, 2000) (FIGURA 5). A composição percentual, em termos de classes de fosfolipídios da membrana espermática é, de modo geral, comparável à das células somáticas, entretanto, as espécies moleculares dentro de cada classe são bastante características da célula espermática (FLESCHE; GADELLA, 2000). Segundo Jones (1998), fosfatidilcolina (PLC), fosfatidiletanolamina (PLE), fosfatidilserina (PLS), esfingomielina (SM) e fosfatidilinositol (PLI) são os principais fosfolipídios e aparecem em maiores quantidades, enquanto o ácido fosfatídico (PA), os lisofosfolipídios (LPC ou LPE), a cardiolipina (CL), os glicolipídios e os esteróis aparecem em menores quantidades. Dentre os esteróis, o colesterol é o que está presente em maior quantidade, seguido pelo desmosterol e sulfato de colesterol (LANGLAIS; ROBERTS, 1985).

Uma subclasse de fosfolipídios tipo éter, os plasmalógenos, são muito abundantes na membrana espermática. Estão presentes na forma de colina (CP) ou etanolamina (EP) e constituem juntos entre 40-50% do total de fosfolipídios da membrana espermática (MARTINEZ; MORROS, 1996; JONES, 1998). Os plasmalógenos são altamente abundantes na membrana espermática de suínos (FUCHS *et al.*, 2009), ovinos (SCOTT *et al.*, 1967) e caprinos (RANA *et al.*, 1991), enquanto que na membrana das células espermáticas de seres humanos e felinos, eles aparecem somente em pequenas quantidades (FUCHS *et al.*, 2009).

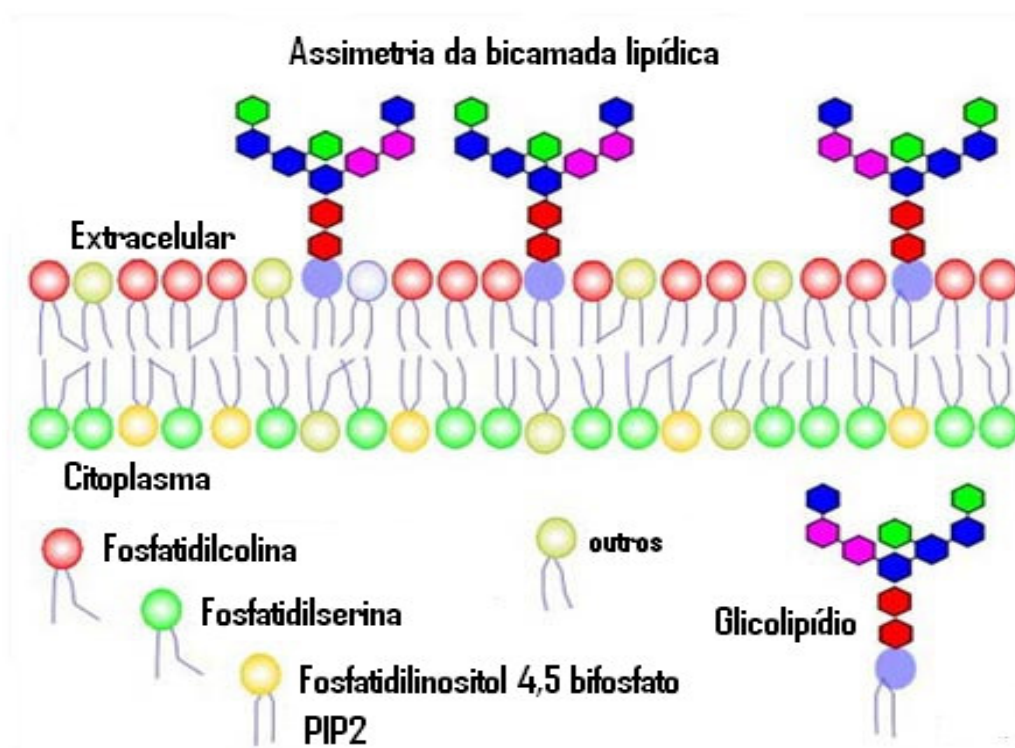


FIGURA 5. Imagem da assimetria da bicamada lipídica encontrada na membrana das células espermáticas. Notar a presença dos diferentes tipos de fosfolipídios predominantes no leito externo, como fosfatidilcolina e glicolipídio, e no leito interno, como fosfatidilserina, fosfatidilinositol.

Fonte: [www.google.com.br](http://www.google.com.br)

A membrana espermática difere daquela das células somáticas também por sua maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, alto conteúdo de plasmalógenos e proporção relativamente baixa entre colesterol e fosfolipídios, que



varia entre 0,20 a 0,83 nMol, dependendo da espécie (CROSS, 1998; JONES, 1998). A sua composição já é conhecida em várias espécies de mamíferos como seres humanos (GRIZARD *et al.*, 2000; LENZI *et al.*, 2000; SCHILLER *et al.*, 2000; SION *et al.*, 2001; LESSIG *et al.*, 2004); bovinos (LESSIG *et al.*, 2004), suínos (CEROLINI *et al.*, 2001), caprinos (RANA *et al.*, 1991), ovinos (SCOTT *et al.*, 1967), coelhos (CASTELLINI *et al.*, 2006), raposas azul e prata (MILLER JR. *et al.*, 2005), canguru, coala, common wombat (MILLER JR. *et al.*, 2004) e elefantes Asiático e Africano (SWAIN *et al.*, 2000).

Em felinos, o conteúdo e a constituição lipídica da membrana espermática de diversas espécies permanecem quase totalmente desconhecidos (AXNÉR, 2006; PUKAZHENTHI *et al.*, 1999; FUCHS *et al.*, 2009). Muito recentemente, as primeiras informações a respeito do assunto foram disponibilizadas com base em amostras de gato doméstico, tigre siberiano e gato Fosa (FUCHS *et al.*, 2009). Neste estudo, amostras de sêmen de epidídimo e ejaculado foram analisadas por espectrometria de massa MALDI-TOF e comparadas com amostras de ruminantes. Em contraste ao espectro destes últimos, que se caracterizam principalmente pela presença de plasmalógenos, presentes em grandes quantidades, somente quantidades marginais destes lipídios foram detectadas no espectro dos felinos, no qual também puderam ser detectadas, apesar das quantidades exíguas de amostras, espécies de fosfatidilcolina, com resíduos de ácidos graxos altamente insaturados, e seminolipídio.

Em função da escassez de dados sobre os lipídios de membrana espermática em felinos e, reconhecendo-se a importância desta composição no comportamento da célula frente aos diferentes estresses da criopreservação, é possível aventar que o conhecimento da composição lipídica da membrana espermática do gato doméstico, principal modelo de pesquisa para felinos selvagens, pode contribuir sobremaneira para a preservação da qualidade do sêmen destes animais, mediante entendimento das características fisiológicas do sêmen. Isto, por sua vez, pode aumentar as chances de sucesso no desenvolvimento de um melhor protocolo de criopreservação de sêmen felino, favorecendo a conservação das espécies ameaçadas (LUVONI *et al.*, 2003ab).

#### 4 OBJETIVOS DO PRESENTE ESTUDO

A partir das informações disponíveis na literatura, a principal proposta deste estudo foi estudar aspectos da fisiologia reprodutiva e determinar o perfil lipídico de espermatozóides da cauda de epidídimo de gatos domésticos. Dentre os objetivos específicos, incluem-se: 1) analisar parâmetros morfológicos e físicos do sêmen de epidídimo de gatos domésticos; 2) mensurar as concentrações sérica e intratesticular de testosterona e 17- $\beta$ estradiol nos gatos domésticos; 3) determinar a eficiência e a atividade espermatogênica em gatos domésticos; 4) determinar o perfil lipídico da membrana dos espermatozóides da cauda do epidídimo de gatos domésticos; 5) verificar possíveis diferenças para todas as variáveis estudadas, comparando-se amostras normospérmicas e teratospérmicas e 6) verificar as possíveis correlações entre as variáveis estudadas.

Esta tese está estruturada em dois capítulos, sendo que no capítulo I são apresentados os resultados e conclusões obtidos no estudo sobre a esteroidogênese testicular em gatos domésticos (*Felis catus*) e sua relação com a morfologia espermática do sêmen da cauda do epidídimo, mediante técnicas de microscopia ótica, método imunoenzimático (ELISA), citometria de fluxo e histomorfometria. Já no capítulo II são apresentados os resultados e conclusões obtidos no estudo sobre a composição lipídica da membrana de espermatozóides da cauda do epidídimo, mediante técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF, ensaio enzimático-fluorescente e colorimétrico.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNEY, T.O. The potencial of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. **Steroids**, v.64, p.610-617, 1999.

AKSOY, Y.; AKSOY, H.; ALTINKAYNAK, K. Sperm fatty acid composition in subfertile men. **Prostaglandins, Leukocits and Essential Fatty Acids**, v. 75, n.2, p. 75-79, 2006.

APEL-PAZ M. A hierarchy of lipid constructs for sperm plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 724-732, 2003.

AVELDANO M. I. *et al.* Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 283, p. 235-241, 1992.

AXNÉR, E.; PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E. *et al.* Creatine phosphokinase in domestic cat epididymal spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 265-270, 2002.

AXNÉR, E.; HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Animal of Reproduction Science**, v.84 (1-2), p.179 – 191, 2004.

AXNÉR E. Sperm maturation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, p. 14-24, 2006.

BAUDI, D.L.; JEWGENOW, K.; PUKAZHENTHI, B.S. *et al.* Influence of cooling rate on the ability of frozen-thawed sperm to bind to heterologous zona pellucida, as assessed by competitive in vitro binding assays in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 204-211, 2008.

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Jounal of Animal Science**, v. 44, p.818-883, 1977.

BLANCO-RODRÍGUEZ, J. DNA replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the cat. **Journal of Andrology**, v. 23, n.4, p. 484-490, 2002.

BONAMIGO, A.; JAVOROUSKI, M.L.; SPERCOSKI, K.M. *et al.* Estudo comparativo da taxa de excreção de corticóides em fêmeas de felinos submetidas à anestesia e laparoscopia. In: **X Evento de Iniciação Científica da UFPR**, 2002, Curitiba-PR. Livro de resumos – 10º EVINCI, 2002.

BRINSKO, S.P. Fisiologia reprodutiva do macho. In: CUNNINGHAN, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.399-405.

CARREAU, S. Germ cell-Sertoli cells interactions and Leydig cell function. In: CARREAU, S. **Cell and molecular biology of the testis, frontiers in endocrinology**. 5<sup>th</sup> ed. Serono Symposia Publications: Rome, 1994. p.137-148.

CARREAU, S. ; GENISSEL, C. ; BILINSKA, B. *et al.* Topical review sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. **International Journal of Andrology**, v.22, p.211-223, 1999.

CARREAU, S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 178, p.65-72, 2001.

CARREAU, S.; BOURGUIBA, S. ; LAMBARD, S. *et al.* Reproductive system: aromatase and estrogens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.193, p.137-143, 2002.

CARREAU, S.; LAMBARD, S. ; DELALANDE, C. *et al.* Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p.1-6, 2003.

CARREAU, S.; DELALANDE, C. ; SILANDRE, D. *et al.* Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, p.65-68, 2006.

CARZOLA, O. ; SECK, M. ; PISSELET, C. *et al.* Anti-müllerian hormona (AMH) secretion in prepubertal and adult rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, n.2, p.259-266, 1998.

CASTELLINI C. *et al.* Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. **Theriogenology**, v. 65, p. 703-712, 2006.

CEROLINI S. *et al.* Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, p. 395-401, 2001.

CONNOR, W.E.; LIN, D.S.; WOLF, D.P. *et al.* Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. **Journal of Lipid Research**, v. 39, p. 1404-1411, 1998.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 07-11, 1998.

DARIN-BENNETT A.; POULOS, A.; WHITE I. G. The effects of cold freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. **Australian Journal Biological Science**, v. 26, p. 1409-1420, 1973.

DANZO, B.J.; ELLER, B.C. The presence of a cytoplasmic estrogen receptor in sexually mature rabbits epididymides: comparison with the estrogen receptor in immature rabbit epididymal cytosol. **Endocrinology**, v.105, p. 1128-1134, 1979.

DE ROBERTS E.; HIB J.; PONZIO R. **De Robertis Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 410p.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T. *et al.* Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental of Zoology**, v. 265, n. 4, p. 432-437, 1993.

D'SOUZA, R.; GILL-SHARMA, M.K.; PATHAK, S. *et al.* Effects of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 241, p. 41-48, 2005.

EVANS R. W.; SETCHELL B. P. Lipid changes during epididymal maturation in ram spermatozoa collected at different times of the year. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 197-203, 1979.

FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 375-387, 2000.

FISHER, J.S.; TURNER, K.J.; FRASER, H.M. *et al.* Immunoexpression of aquaporin-1 in the efferent ducts of the rat and marmoset monkey during development, its modulation by estrogens, and its possible role in fluid resorption. **Endocrinology**, v.139, p.3935-3945, 1998.

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p. 107-235, 2000.

FREE; M.J.; JAFFE, R.A. Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. **Biology of Reproduction**, v. 99, p. 1618-1630, 1979.

FOSTER, P.M. Testicular organization and biochemical function. In: LAMB, J.C. **Physiology and Toxicology of Male Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p.7-34.

FRANÇA, L.R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R. *et al.* Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 59, p.1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology and Reproduction**, v. 68, p. 1554-1561, 2003.

FUCHS B. *et al.* MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. **Theriogenology**, v. 71, p. 568-575, 2009.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 1988. p.187-211.

GLIOZZI T. M. *et al.* Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. **Theriogenology**, v. 71, p. 910-919, 2009.

GÖRITZ, F.; NEUBAUER, K.; NAIDENKO, S. *et al.* Investigations on reproductive physiology in the male Eurasian lynx (*Lynx lynx*). **Theriogenology**, v.66, n.7, p.1751-1754, 2006.

GOYAL, H.O.; BARTOL, F.F.; WILEY, A.A. *et al.* Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. **Anatomy Research**, v. 249, p.54-62, 1997.

GRISWOLD, M.D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. **Biology of Reproduction**, v. 52, p.211-216, 1995.

GRIZARD, G. *et al.* Separation and quantification of cholesterol and major phospholipids classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. **Journal of Chromatography B**, v. 740, p. 101-109, 2000.

GULAYA N. M. *et al.* Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Achieves of Andrology**, v. 4 p. 169-175, 2001.

HAY, M.A.; GOODROWE, K.L. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 47, p.297-305, 1993.

HESS, R.A.; BUNICK, D.; BAHR, J.M. Sperm, a source of estrogen. **Environmental Health Perspectives**, v.103, suppl.7, p.59-62, 1995.

HESS, R.A.; GIST, D.H.; BUNICK, D. *et al.* Estrogen receptor ( $\alpha$  e  $\beta$ ) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. **Journal of Andrology**, v.18, p.602-611, 1997a.

HESS, R.A.; BUNICK, D.; LEE, K. *et al.* A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature**, v.390, n.4, p.509-512, 1997b.

HESS, R. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.84-92, 2000.

HOWARD, J.D.; BUSH, M.; HALL, L.L., *et al.* Morphological abnormalities of spermatozoa of 28 species of non-domestic felids. **Proceedings of International Community of Animal Reproduction and Artificial Insemination**, v. 2, p. 57-59, 1986.

HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M. *et al.* Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones in improvement of spermatozoal viability and morphology after swim processing. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 204-215, 1990.

IGUSHI, T. ; UESUGUI, Y. ; SATO, T. *et al.* Developmental pattern of estrogen receptor expression in male Mouse genital organs. **Molecular Andrology**, v.6, p. 109-119, 1991.

JAMES, P.S. ; WOLFE, C.A. ; LADHA, S. *et al.* Lipid diffusion in the plasma membrane of ram and boar spermatozoa during maturation in the epididymis measured by fluorescence recovery after photobleaching. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, p. 207-215, 1999.

JEFFERSON, W.N.; COUSE, J.F.; BANKS, E.P. *et al.* Expression of estrogen receptor  $\beta$  is developmentally in reproductive tissues of male and female mice. **Biology of Reproduction**, v.62, p.310-317, 2000.

JOHNSON, W.E.; DRATCH, P.A.; MARTENSON, J.S.; O'BRIEN, S.J. Resolution of recent radiations within three evolutionary lineages of Felidae using mitochondrial restriction fragment length polymorphism variation. **Journal of Mammal Evolution**, v.3, p.97-120, 1996.

JONES R. Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 53, p. 73-84, 1998.

JONES, R.; JAMES, P.S.; HOWES, L. Supramolecular organization of the sperm plasma membrane during maturation and capacitation. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 4, p. 438-444, 2007.

KELCH, R.P.; JENNER, M.R.; WEINSTEIN, R. *et al.* Estradiol and testosterone secretion by human, simian and canine testes, in males with hypogonadism and in male pseudohermaphrodite with the feminizing testes syndrome. **Journal of Clinical Investigation**, v. 51, p.824-830, 1972.

KERR, J.B. The Cytology of the human testis. In: BURGER, H., KRETZER, D. **The testis**. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press: New York, 1989. p.197-229.

KIRKPATRICK, J.F. Seasonal testosterone level, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. **Canadian Journal of Zoology**, v.63, p.1285-7, 1985.

KREGE, J.H.; HODGIN, J.B.; COUSE, J.F. *et al.* Generation and reproductive of mice lacking estrogen receptor beta. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 95, p. 15677-15682, 1998.

KWON, S., HESS, R.A., BUNICK, D. *et al.* Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 378-384, 1997.

KUIPER, G.J.M., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M. *et al.* Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of National Academy Science of United States of America**, v. 93, p.5925-5930, 1996.

LANGLAIS J.; ROBERTS K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Research**, v. 12, p. 183-224, 1985.

LEACH, R.B., MADDOCK, W.O., TOKUYAMA, I. *et al.* Clinical studies of testicular hormone production. **Recent Progress in Hormone Research**, v.12, p.377-397, 1956.

LEITE, F.L.G., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P. *et al.* Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). **Animal Reproduction Science**. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.04.003.

LENZI A. *et al.* Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 2000.

LESSIG J. *et al.* Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 137, p. 265-277, 2004.

LINDBURG, D.G., DURRANT, B.S., MILLARD, S.E. *et al.* Fertility assessment of cheetah males with poor quality semen. **Zoo Biology**, v.12, n.1, p.97-103, 1993.

LUBAHN, D.B., MOYER, J.S., GOLDING, T.S. *et al.* Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proceedings of National Academy Science of United States of America**, v. 90, p.11162-11166, 1993.

LUVONI, G.C., KALCHSCHMIDT, E., LEONI, S. *et al.* Conservation of feline semen Part I: Cooling and Freezing protocols. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.5, p. 203-208, 2003a.

LUVONI, G.C., KALCHSCHMIDT, E., MARINONI, G. Conservation of feline semen Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.5, p. 257-263, 2003b.

LUVONI, G.C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 101-111, 2006.

MARTINEZ, P., MORROS, A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p.103-117, 1996.

MEISTRICH, M.L., HUGHES, T.J., BRUCE, W.R. Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. **Nature**, v.258, p.145-147, 1975.

MILLER JR. R. R. *et al.* Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. **Cryobiology**, v. 49, p. 137-148, 2004.

MILLER JR. R. R. *et al.* Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. **Cryobiology**, v. 51, p. 66-75, 2005.

MORAES, W.; MORAIS, R.N.; MOREIRA, N.; LACERDA, O.; GOMES, M.L.F.; MUCCILOLO, R.G.; SWANSON, W.F. Successful artificial insemination after exogenous gonadotropin treatment in the ocelot (*Leopardus pardalis*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). In: AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS ANNUAL MEETING, Houston, 1996. **Proceedings**, p. 334–336.

MORAIS, R.N., MUCCILOLO, R.G. Estudo da fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Felis pardalis*, *Felis wiedii* e *Felis tigrina*). **Relatório final de pesquisa apresentado à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**. Processo 94/44661, 1997.



MORAIS, R.N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758; *Leopardus wiedii*, Schinz, 1821; e *Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775): Sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais**. São Paulo, 2000. 177 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal.

MORAIS, R.N. Reproduction in small felid male. In: FOWLER, M.E., CUBAS, Z.S. **Biology, medicine and surgery of South America wild animals**. Iowa: Iowa State University Press, 2001. p.312-316.

MORAIS, R.N., MUCCILOLO, R.G., GOMES, M.L.F. *et al.* Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v.57, p.2027-2041, 2002.

NIE, R., ZHOU, Q., JASSIM, E. *et al.* Differential expression of estrogen receptors  $\alpha$  e  $\beta$  in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1161-1168, 2002.

NEUBAUER, K., JEWGENOW, K., BLOTTNER, S. *et al.* Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Biology of reproduction**, v. 71, n.5, p. 1517-1524, 2004.

NORWELL, K. Cats on the 2009 red list of threatened species. **Cats news**, n. 51, p. 32-33, 2009.

O'DONNELL, L., McLACHLAN, R.I., WREFORD, N. *et al.* Testosterone promotes the conversion of round spermatids between stages VII and VIII of the rat spermatogenic cycle. **Endocrinology**, v. 135, p. 2608-2614, 1994.

O'DONNELL, L., ROBERTSON, K.M., JONES, M.E. *et al.* Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.22, n.3, p.289-318, 2001.

PARKS J. E.; LYNCH D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255-266, 1992.

PARKS J. E.; HAMMERSTEAD R. H. Developmental Changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 653-668, 1985.

POULOS A.; DARIN-BENNETT A.; WHITE A. G. The phospholipid bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 46, p. 375-385, 1973.

PUKAZHENTHI, B., PELICAN, K., WILDT, D.E. *et al.* Sensivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 135-141, 1999.

PUKAZHENTHI, B., NOILES, E., PELICAN, K. *et al.* Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. **Cryobiology**, v. 40, p. 139-150, 2000.

PUKAZHENTHI, B.S., WILDT, D.E., HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 57, p.423-433, 2001.

PUKAZHENTHI, B., SPINDLER, R., WILDT, D. *et al.* Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 44, p. 288-300, 2002.

PUKAZHENTHI, B.S., NEUBAUER, K., JEWGENOW, K. *et al.* The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its relatives. **Theriogenology**, v. 66, p. 112-121, 2006.

PURDY, P.H., GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, p. 36-45, 2004.

RANA A. P. S. *et al.* Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1061, p. 185-196, 1991.

RISBRIDGER, G.P., KRETZER, D.M. Paracrine Regulation of the testis. In: BURGER, H., KRETZER, D. **The testis**. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press: New York, 1989. p.255-268.

ROELKE, M.E., MARTENSON, J.S., O'BRIEN, S.J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida Panther. **Current Biology**, v. 3, p. 34-350, 1993.

ROMMERTS, F.F.G. How much androgen is required for maintenance of spermatogenesis? **Journal of Endocrinology**, v. 116, p.7-9, 1988.

ROOKE J. A.; SHAO C. C.; SPEAKE B. K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, v. 121, p. 315-322, 2001.

ROSENFELD, C.S., GANJAM, V.K., TAYLOR, J.A. *et al.* Transcription and translation of estrogen receptor-beta in the male reproductive tract of estrogen receptor-alpha knock-out and wild-type mice. **Endocrinology**, v.139, p.2982-2987, 1998.

RUSSELL, L.D., MALONE, J.P., KARPAS, S.L. Morphological pattern elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation. **Tissue and Cell**, v.13, p.369-380, 1986.

SAUNDERS, P.T.K., SHARPE, R.M., WILLIAMS, K. *et al.* Differential expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. **Molecular Human Reproduction**, v.7, p.227-336, 2001.

SCHILLER J. *et al.* Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy – effects of freezing and thawing. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 106, p. 145-156, 2000.

SCOTT T. W., VOGLMAYR J. K.; SETCHELL B. P. Lipid Composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 456-461, 1967.

SHARPE, R.M., MADDOCK, S., KERR, J.B. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Ledig cell destruction and testosterone replacement. **American Journal of anatomy**, v.188, p. 03-20, 1990.

SHARPE, R.M. Intratesticular control of steroidogenesis. Review. **Clinical Endocrinology**, v. 33, p. 787-807, 1990.

SHETTY, G., KRISHNAMURTHY, H., KRISHNAMURTHY, H.N. *et al.* Effect of oestrogen deprivation on the male reproductive physiology of male and female primates. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular biology**, v.61, n.3-6, p.157-166, 1997.

SCHÖN, J., NEUMANN, S., WILDT, D.E. *et al.* Localization of oestrogen receptors in the epididymis during sexual maturation of domestic cat. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 44, suppl. 2, p. 294-301, 2009.

SION B., GRIZARD D., BOUCHER D. *et al.* Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 935, p. 259-265, 2001.

SWAIN J. E.; MILLER JR R. R. A post-cryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. **Zoo Biology**, v. 19, p. 461-473, 2000.

TSUTSUMI, I., FUGIMORI, K., NAKAMURA, R.M. *et al.* Disruption of seminiferous epithelial function in the rat by ovarian protein. **Biology of Reproduction**, v.36, p.451-461, 1987.

TSUTSUI, T., WADA, M., ANZAI, M., HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.65, p. 397-399, 2003.

TSUTSUI, T., KUWABARA, S., KUWABARA, K. *et al.* Development of spermatogenic function in the sex maturation process in male cats. **Journal of Veterinary and Medicine Science**, v. 66, n.9, p.1125-1127, 2004.

WILDT, D.E., BUSH, M., HOWARD, J.G. *et al.* Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 29, p.1019-1025, 1983.

WILDT, D.E., BUSH, M., GOODROWE, K.L. *et al.* Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**, v.329, p.328-331, 1987.

WILDT, D.E. Endangered species spermatozoa: diversity, research and conservation. In: BARTKE, A. **Functions of somatic cells in the testis**. New York: Springer-verlang Inc.1994, p.1-24.

WHITE I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 639-658, 1993.

ZAMBELI, D., CANEPPELE, B., CASTAGNETTI, C. *et al.* Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, p.310-313, 2002.

ZHANG, Q., BAI, Q., YUAN, Y. *et al.* Assessment of seminal estradiol and testosterone levels as predictors of human spermatogenesis. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 215-220, 2010.

ZONDEK, B. Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of stallion. **Nature**, v. 193, p.209-210, 1934.

## **CAPÍTULO I**

# **PROPORÇÃO ENTRE TESTOSTERONA E ESTRADIOL INTRATESTICULAR NOS GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) E SUA RELAÇÃO COM A ESPERMATOGÊNESE E MORFOLOGIA DOS ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO.**

**Colaboradores: Anderson Martino Andrade,  
Andrei Souza dos Santos,  
Ângela Reghelin,  
Daniela Magalhães Ribeiro Garcia,  
Giulia Rafaela Dainez Sant'Ana,  
Katherinne Maria Spercoski,  
Katlyn Barp Meyer,  
Sandra Maria de Torres,  
Valdemiro Amaro da Silva Júnior.**

## I 1. INTRODUÇÃO

A espermatogênese é um processo cíclico e contínuo, altamente complexo, orquestrado em uma série de divisões celulares, durante as quais uma espermatogônia prolifera em estágios precisos do epitélio seminífero, dando origem a espermatozóides (KERR, 1989; O'DONNELL *et al.*, 2001; BLANCO-RODRÍGUEZ, 2002; FRANÇA; GODINHO, 2003). Este processo é determinado geneticamente (FRANÇA; RUSSELL, 1998; FRANÇA *et al.*, 1998) e, em geral, está dividido em três fases altamente ritmadas denominadas de proliferação, meiose e diferenciação (FOSTER, 1988; GARNER; HAFEZ, 1988; BRINSKO, 1999; HESS, 1999; JOHNSON *et al.*, 2000). A duração total da espermatogênese, que compreende 4,5 ciclos e se completa em 46,8 dias nos gatos domésticos e 44,5 dias nos pumas (FRANÇA; GODINHO, 2003; LEITE *et al.*, 2005), é considerada espécie-específica e relativamente constante para cada espécie, de modo que a frequência dos estágios, assim como o comprimento do ciclo dificilmente variam (WEINBAUER *et al.*, 1998; ASLAM *et al.*, 1999; O'DONNELL *et al.*, 2001). Entretanto, diferenças podem ser encontradas na literatura para membros da mesma espécie (FRANÇA; RUSSEL, 1998).

O controle endócrino da espermatogênese no testículo dos mamíferos sofre ação coordenada principalmente das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), mas também dos hormônios esteróides juntamente com numerosos fatores locais produzidos pelas células germinativas, células de Sertoli e de Leydig (O'DONNELL *et al.*, 2001; SAEZ, 1994). Estas últimas são responsáveis pela biossíntese de testosterona e constituem a principal fonte de estrogênios no testículo dos mamíferos e ratos adultos (CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU *et al.*, 2002; CARREAU *et al.*, 2003).

A testosterona, juntamente com os demais hormônios androgênicos, é essencial para a diferenciação sexual, manutenção da função dos órgãos sexuais acessórios e das características sexuais secundárias e para o início e manutenção da espermatogênese (ROMMERTS, 1988; RISBRIDGER; KRETZER, 1989; CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU, 2001; CARREAU *et al.*, 2002; CARREAU *et al.*, 2006). A testosterona também é capaz de modular a espermatogênese, principalmente por sua ação sobre as células de Sertoli (LYU; HANDELSMAN,

2003), as quais são responsáveis pela sustentação e nutrição das células germinativas (SHARPE *et al.*, 1990; SHARPE, 1990; ABNEY, 1999; O'DONNELL *et al.*, 2001). Durante este processo, os efeitos da testosterona são altamente específicos, ocorrendo em determinados estágios VII e VIII do desenvolvimento das células germinativas de ratos (RUSSELL *et al.*, 1981; SHARPE *et al.*, 1990; SHARPE, 1990). Em gatos domésticos, a concentração sérica de testosterona pode variar desde 0,02 ng/mL até 18,2 ng/mL em animais adultos (KIRKPATRICK, 1985; HOWARD *et al.*, 1990; TSUTSUI *et al.*, 1990; JOHNSTON *et al.*, 1996), enquanto a concentração intratesticular varia de 823ng/g até 1239ng/g de testículo (NEUBAUER *et al.*, 2004).

Apesar da presença dos estrogênios ter sido documentada na gônada masculina há mais de 50 anos, eles sempre foram considerados hormônios essencialmente femininos (ZONDEK, 1934; LEACH *et al.*, 1956; CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU, 2001). Porém, crescentes evidências têm demonstrado que os estrogênios desempenham um papel crucial na regulação da espermatogênese (BILINSKA *et al.*, 2001; O'DONNELL *et al.*, 2001; HESS *et al.*, 2001; HESS, 2003; CARREAU *et al.*, 2006; SCHÖN; BLOTTNER, 2008; SCHÖN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; AVENEL *et al.*, 2010a, 2010b), atuando por meio de receptores nucleares (ER), ER $\alpha$  e ER $\beta$ , (CARREAU *et al.*, 1999; CARREAU *et al.*, 2002; CARREAU *et al.*, 2006), já detectados nos tecidos do trato genital masculino de humanos e diversas espécies animais (DANZO; ELLER, 1979; IGUSHI *et al.*, 1991; GOYAL *et al.*, 1997; HESS *et al.*, 1997ab; KWON *et al.*, 1997; ROSENFELD *et al.*, 1998; JEFFERSON *et al.*, 2000; SAUNDERS *et al.*, 2001; NIE *et al.*, 2002), incluindo o gato doméstico (NIE *et al.*, 2002; SCHÖN *et al.*, 2009). A concentração sérica de estrogênios é muito baixa em machos e varia de 2 a 180pg/mL, de acordo com a espécie, sendo excepcionalmente alta nos machos eqüinos, com concentrações de até 2447pg/mL. Como a testosterona, as concentrações de estrogênios são tipicamente maiores nos tecidos do trato genital masculino e suas secreções, variando de 11,5pg/mL na *rete testis* do touro até 4116pg/mL no sêmen de cavalos (HESS, 2000). Em felinos, nenhum registro das concentrações intratesticulares de estrogênios foi encontrado.

Muitas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de esclarecer o papel dos estrogênios na função testicular (BILINSKA *et al.*, 2001; O'DONNELL *et al.*, 2001; HESS *et al.*, 2001; HESS, 2003; SCHÖN; BLOTTNER, 2008; SCHÖN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010). Sabe-se que os estrogênios apresentam efeito inibitório

na biossíntese de testosterona pelas células de Leydig, mediante efeito direto no testículo (AMADOR *et al.*, 1989; ABNEY, 1999). Na espermatogênese, um efeito antiapoptótico direto foi observado nas células germinativas do epitélio seminífero de ratos com altas concentrações de  $17\beta$ -estradiol intratesticular (D'SOUZA *et al.*, 2005).

Além das alterações no ambiente endócrino, os estrogênios são também capazes, mediante regulação da absorção de fluido nos ductos eferentes e região proximal do epidídimo (HESS *et al.*, 1997a; FISHER *et al.*, 1998), de influenciar a concentração e aquisição de várias propriedades móveis, morfológicas e bioquímicas dos espermatozóides (HESS *et al.*, 1997ab; CARREAU *et al.*, 1999; HESS, 2000; O'DONNELL *et al.*, 2001; CARREAU *et al.*, 2006). Reduções significativas dos percentuais de motilidade e vigor espermáticos foram observadas em espermatozóides recuperados do epidídimo de camundongos deficientes para o receptor de estrógenos, subtipo alfa ( $ER\alpha$ ; *knockout*  $ER\alpha$ ; JOSEPH *et al.*, 2010a), assim como formas mais severas de defeitos flagelares, como flagelo fortemente enrolado (JOSEPH *et al.*, 2010b). Em contraste, nos seres humanos, concentrações mais altas de estradiol no plasma seminal foram observadas em indivíduos oligozoospermicos e oligoteratozoospermicos, em comparação com indivíduos normais (BUJAN *et al.*, 1993; LUBOSHITZKY *et al.*, 2002).

Em felinos, a presença de mais de 60% de espermatozóides morfolologicamente anormais no ejaculado, condição denominada de teratospermia, tem sido considerada um fator de grande relevância reprodutiva nos gatos domésticos e felinos selvagens, sendo que 28 espécies da família dos felinos são afetadas por esta condição (HOWARD *et al.*, 1990; WILDT, 1994; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; 2002). As causas da teratospermia ainda permanecem desconhecidas, entretanto, fatores genéticos, ambientais e hormonais, como baixas concentrações de testosterona (HOWARD *et al.*, 1990), provavelmente possam interferir na regulação da proporção de espermatozóides morfolologicamente normais (LINDBURG *et al.*, 1993). Entretanto, conforme JEWGENOW *et al.* (2009), a teratospermia também pode ser uma condição “ocasional”, na qual gatos domésticos produzem periodicamente maiores percentuais de espermatozóides anormalmente formados, devido à regulação sazonal (BLOTTNER; JEWGENOW, 2007) ou mesmo à abstinência sexual, a fatores nutricionais e de saúde. Este tipo de teratospermia é geralmente acompanhado de produção espermática reduzida.



Apesar dos estudos já realizados em felinos, pouco esclarecimento sobre a etiologia e os mecanismos patofisiológicos da teratospermia nesta espécie foi conseguido (PUKAZHENTHI *et al.*, 2001; JEWGENOW *et al.*, 2009), particularmente no que se refere ao equilíbrio entre androgênios e estrogênios no ambiente testicular. Deste modo, o objetivo deste estudo foi estudar a esteroidogênese testicular de gatos domésticos, mediante a determinação das concentrações sérica e intratesticular de testosterona e 17 $\beta$ -estradiol e correlacionar estes dados com os resultados da avaliação física e morfológica dos espermatozoides da cauda do epidídimo e o grau de atividade espermatogênica. A hipótese a ser testada é a de que reduções nas proporções entre testosterona:estradiol (T:E2) intratesticular podem levar ao aumento do percentual de espermatozoides anormais no epidídimo e alterar a eficiência espermatogênica.

## I 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 ANIMAIS E ORQUIECTOMIAS.

Os animais incluídos neste estudo foram 49 gatos domésticos (*Felis catus*), com idade entre 10 e 96 meses (idade média  $20,80 \pm 1,87$  meses) e volume testicular  $\geq 1,0$  mL. Todos eram sem raça definida, hígidos ao exame clínico e provenientes de proprietários particulares. Para obtenção dos testículos, os animais foram submetidos à orquiectomia bilateral no Laboratório de Fisiologia da Reprodução da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram colhidas apenas durante a época mais favorável à reprodução dos felinos, nos meses de primavera e verão (desde o equinócio de primavera até o equinócio de outono), a fim de se evitar o efeito sazonal sobre a função testicular (KIRKPATRICK, 1985; BLOTTNER; JEWGENOW, 2007).

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a 6 horas de jejum hídrico e 12 horas de jejum alimentar. Após aferir o peso corporal, a anestesia foi induzida com uma combinação de cloridrato de cetamina (Vetaset, Fort Dodge; 20 mg/kg; IM) e xilazina (Ronpum 2%, Bayer, São Paulo; 1,0 mg/kg; IM) e o procedimento cirúrgico foi realizado segundo técnica de Slatter (1999). Logo após a indução anestésica, uma amostra de sangue foi colhida e o soro foi separado e congelado para análises hormonais.

O volume de cada testículo foi estimado a partir de medidas de comprimento e largura realizadas com paquímetro (Oberg; Jones, 1969 *apud* HOWARD, 1993) e foi utilizado para o cálculo do índice gonadossomático (IGS), valor que representa o peso testicular em relação ao peso corporal (peso do testículo/peso corporal x 100). Todos os procedimentos foram realizados com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Paraná e após os devidos esclarecimentos e obtenção de consentimento formal dos proprietários dos animais.

## 2.2 OBTENÇÃO, ANÁLISE FÍSICA E MORFOLÓGICA DOS ESPERMATOZÓIDES DO EPIDÍDIMO

Para obtenção dos espermatozóides, o epidídimo foi cuidadosamente separado do testículo e dos vasos sanguíneos associados e, após, lavado com PBS a 37°C para a remoção dos resíduos de sangue. As caudas de cada epidídimo foram separadas e transferidas para placa de Petri contendo 2mL de Ham's F10 em temperatura ambiente e, a seguir, submetidas a várias incisões com lâmina, de modo a permitir a liberação dos espermatozóides no meio (AXNÉR *et al.*, 2002). Uma alíquota de 2,5 a 5 uL deste fluido contendo os espermatozóides foi fixada em 100 µL de glutaraldeído 0,3% (v:v em PBS) para análise morfológica (detalhes adiante). O restante do fluido foi, em seguida, filtrado em malha de náilon de 40µm e centrifugado (600 g/10 min.). Após remoção do líquido sobrenadante, os espermatozóides foram ressuspensos em 100µL de Ham's F10 (Cultilab, Campinas, SP) contendo 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP), 0,06% de penicilina e 0,1% de estreptomicina. A suspensão espermática, assim obtida, foi submetida ao protocolo padrão de avaliação física (SPINDLER; WILDT, 1999), tendo sido registrado o volume (µl), a motilidade espermática (%), o vigor espermático (0 – 5; sendo 0= ausência de movimento e 5= movimento máximo), índice de motilidade espermática, concentração espermática ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) e total de espermatozóides por amostra ( $\times 10^6$ ) (MORAIS, 2000; MORAIS *et al.*, 2002).

Para a morfologia espermática, a amostra fixada em glutaraldeído foi analisada em preparação de câmara úmida sob contraste de fase (1000 x). Um total de 200 células foi analisado para cada amostra e os defeitos classificados conforme Howard *et al.* (1990). Após análise dos resultados, as amostras foram classificadas como normospérmicas, como sugerido por Howard *et al.* (1990), na condição de pelo menos 60% dos espermatozóides serem morfolologicamente normais. Todas as demais amostras foram classificadas neste estudo como teratospérmicas e não apenas aquelas com menos de 40% de espermatozóides normais, segundo o critério de Howard *et al.* (1990). Como a classificação de felinos em indivíduos normospérmicos e teratospérmicos implica na análise de pelo menos dois ejaculados consecutivos de um mesmo indivíduo (AXNÉR *et al.*, 1998, 1999), o que

não foi possível no presente estudo, por questões éticas e de bem estar animal, o critério de classificação refere-se apenas a amostra e não ao indivíduo. Além disso, as gotas citoplasmáticas distais (GCD) não foram incluídas na porcentagem de espermatozoides morfologicamente anormais, conforme Axné *et al.* (2004), uma vez que elas são consideradas normais para amostras de epidídimo, sendo normalmente perdidas durante a ejaculação (AXNÉR *et al.*, 1999; AXNÉR; LINDEFORSBERG, 2007).

## 2.3 PREPARAÇÃO DOS TESTÍCULOS

Os testículos foram dissecados do epidídimo e um dos testículos foi armazenado a -20° para análises hormonais e citometria de fluxo, enquanto o outro foi transversalmente incisado e fixado por imersão em glutaraldeído 4% (VETEC, Brasil) (v:v em PBS) durante duas horas. Em seguida, os fragmentos foram lavados em PBS (pH 7,4) e transferidos para recipiente contendo álcool 70%, onde ficaram imersos e armazenados até o emblocamento e histomorfometria, conforme descrito por França; Godinho (2003).

Para a determinação dos esteróides intratesticulares, o testículo foi descongelado e alíquotas de tecido testicular foram pesadas antes de serem submetidas ao processo de liofilização, conforme descrito a seguir. Sendo assim, a porcentagem de água presente no testículo foi estimada com base na diferença da massa úmida do fragmento testicular e na massa seca, obtida após a liofilização.

## 2.4 DETERMINAÇÃO SÉRICA E INTRATESTICULAR DE TESTOSTERONA E 17 $\beta$ -ESTRADIOL

### 2.4.1 Extração hormonal dos testículos e do soro

Para a quantificação hormonal, um a três fragmentos de testículo (~0,2 g) foram obtidos da área ao redor da *rete testis*. Após liofilização e pulverização, os mesmos foram diluídos em tubos de vidro contendo 0,75mL de metanol 90% e, os esteróides foram extraídos sob agitação pulsátil, em agitador de multipulso (Multi-Pulse Vortexer, modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®), durante 30 minutos. As amostras foram centrifugadas (1000 *g*/ 15 min) e o supernadante foi removido. O processo foi repetido mais uma vez e o total de extrato obtido (~1,5 mL) foi envasado em tubos devidamente identificados (S. BLOTTNER, comunicação Pessoal –. Leibniz Institute für Zoo- und Wildtierforschung, Berlin, Alemanha). Os extratos permaneceram armazenados a -20°C até a dosagem hormonal (NEUBAUER *et al.*, 2004).

Apenas para a quantificação de estradiol, os esteróides presentes no soro foram extraídos em éter (Sigma, Sant Louis, MO), na proporção 1:4 (v:v), sob agitação pulsátil, em agitador multipulso (Multi-Pulse Vortexer, modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Colâ), durante 15 min, à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas (1000 *g*/ 5 min) colocadas sobre o vapor do nitrogênio líquido e a fase de éter superior passada para outro tubo e evaporada. Após, as amostras foram diluídas com solução tampão de ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), sonicadas para homogeneização da mistura, envasadas, identificadas e congeladas para posterior dosagem hormonal.

### 2.4.2 Dosagem de testosterona e 17 $\beta$ -estradiol

A testosterona sérica e intra-testicular, assim como o 17 $\beta$ -estradiol intratesticular foram quantificados por meio de enzimaímunoensaio (ELISA),

utilizando-se anticorpo policlonal anti-testosterona (R156/7) e anti-17 $\beta$ -estradiol (R4972) nas diluições de 1:7.500 e 1:10.000, respectivamente. Como marcador conjugado foram utilizados testosterona-HRP (horseradish peroxidase) na diluição 1:15.000 e 17 $\beta$ -estradiol-HRP na diluição 1:50.000. Tanto os anticorpos como os respectivos conjugados foram obtidos da Dra. Coralie Munro (University of Califórnia, Davis, CA, USA). As técnicas de validação e dosagem seguiram protocolos anteriormente descritos (STABENFELDT *et al.*, 1991). O paralelismo entre a curva gerada a partir de diluições seriadas (12 até 1/2048) de “pools” dos extratos de testículo e de soro com aquelas obtidas com os hormônios padrão foi demonstrado ( $R^2 = 0,97$  e  $R^2 = 0,99$ , respectivamente, para testosterona testicular e sérica e  $R^2 = 0,95$  para estradiol intratesticular). Todas as amostras foram lidas em duplicata e os coeficientes de variação intra e inter-ensaio para ambos os hormônios foram  $<10\%$ . Os resultados são expressos em ng/g de testículo e ng/mL de soro.

O 17 $\beta$ -estradiol sérico foi quantificado utilizando-se um kit de ELISA comercial (Kit de Estradiol Humano, Cat. 55030, Human GmbH) e o procedimento foi realizado conforme indicação do fabricante. Os extratos puros de soro foram utilizados para dosagem que foi feita em duplicata e os resultados são mostrados em pg/mL.

## 2.5 ANÁLISE DA ESPERMATOGÊNESE POR HISTOMORFOMETRIA

### 2.5.1 Morfometria testicular

As análises histomorfométricas foram realizadas de acordo com França; Godinho (2003). Para tanto, um fragmento de testículo foi processado conforme técnica histológica de rotina e embebidos em resina plástica à base de glicol metacrilato. Em seguida, secções de 3  $\mu$ m de espessura foram obtidas e coradas com azul de toluidina. O diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero foram mensurados utilizando-se uma régua micrométrica (U-OCMSQ10/10-Olympus, Tóquio, Japão) adaptada a uma das oculares de 10x, em ampliação de 100x. As mensurações foram realizadas, ao acaso, em 30 secções transversais de túbulo

seminífero, apresentando contorno mais circular possível, para cada amostra animal. A proporção volumétrica (%) e o volume dos vários componentes teciduais do testículo foram estimados aleatoriamente em 15 campos (6615 pontos), com aumento de 400x, utilizando-se uma grátula integradora com 441 pontos (Olympus, Tóquio, Japão) acoplada à ocular do microscópio óptico (BX51 Olympus, Tóquio, Japão). Artefatos encontrados não foram considerados no número total de pontos utilizados para a determinação destas proporções e volumes. Os pontos foram classificados em: (1) compartimento tubular, compreendendo túnica própria, epitélio seminífero e o lume, e (2) compartimento intertubular, compreendendo as células de Leydig, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos. O volume de cada componente testicular foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e volume líquido estimado do testículo, o qual foi obtido mediante subtração do peso da túnica albugínea e do mediastino testicular (FRANÇA *et al.*, 2000) do peso bruto do testículo. Para os cálculos subseqüentes de morfometria, o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume, já que a sua densidade é de cerca de 1 (1,03 a 1,04; FRANÇA *et al.*, 2000). O comprimento total do túbulo seminífero (m) foi calculado dividindo-se o volume total de túbulo seminífero pela área de secção transversal dos túbulos seminíferos vezes o valor de pi ( $\pi$ ) (DORST; SAJONSKI, 1974).

#### 2.5.2 Contagem celular e estimativa do total de células em túbulos seminíferos no estágio 1

A estimativa dos diferentes tipos celulares que compõe o epitélio seminífero foi feita no estágio 1 do ciclo, porque neste estágio tanto a espermiacção quanto as células germinativas podem ser observadas. Esta estimativa foi feita mediante contagens dos núcleos das células germinativas e nucléolos das células de Sertoli em 10 secções transversais, escolhidas aleatoriamente, para cada amostra animal. As contagens foram corrigidas para o diâmetro nuclear ou nucleolar e espessura do corte, segundo Abercrombie (1946), modificada por Amann; Almquist (1962). Para cada tipo celular analisado por animal, 10 diâmetros nucleares ou nucleolares foram mensurados com auxílio de uma régua micrométrica

adaptada a uma das oculares e acoplada à objetiva de 100x, propiciando um aumento de 1000x. Esta contagem foi utilizada para cálculo dos índices de rendimento intrínseco da espermatogênese, quais sejam: (1) índice de célula de Sertoli por espermátides arredondadas; (2) índice de célula de Sertoli por células germinativas; (3) coeficiente de mitoses espermatogoniais: espermatócitos preleptóteno/leptóteno por espermatogônia A (EPL/Gonia A); (4) índice meiótico: espermátides arredondadas por espermatócitos paquíteno (EAr/EPQ); (5) índice de apoptose celular – calculado com base no valor de espermátides arredondadas por espermatócito secundário teoricamente esperado.

O número total de células de Sertoli por testículo foi obtido a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 e comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo, conforme Hochereau-de-Reviers; Lincoln (1978). A produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo (eficiência da espermatogênese) foi realizada de acordo com França (1992), como segue:  $PED = \text{número total de células de Sertoli por testículo} \times \text{proporção de espermátides arredondadas por células de Sertoli no estágio 1} \times \text{frequência relativa do estágio 1}(\%)/\text{duração do estágio 1}(\text{dias})$ .

O volume individual das células de Leydig foi obtido a partir do volume do núcleo e da proporção entre núcleo e citoplasma. Como o núcleo das células de Leydig do gato doméstico é esférico, seu volume nuclear foi obtido mediante conhecimento do diâmetro nuclear médio. Para isso, somente 30 núcleos apresentando-se o mais esférico possível e com cromatina perinuclear e nucléolos bem visíveis foram contados para cada amostra animal. O volume nuclear de Leydig foi expresso em  $\mu\text{m}^3$  e foi obtido mediante fórmula  $(4/3\pi R^3)$ , onde  $R = \text{diâmetro nuclear}/2$ . A fim de calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, utilizou-se um retículo com 441 intersecções (pontos) em aumento de 400x. Três mil pontos sobre as células de Leydig foram contados para cada animal e o número de células de Leydig por testículo foi estimado a partir do volume individual das células de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ) e o volume ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular (FRANÇA; GODINHO, 2003).



## 2.6 ANÁLISE DA ESPERMATOGÊNESE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A técnica utilizada foi a mesma descrita por Neubauer *et al.* (2004). Brevemente, após o descongelamento do testículo e remoção da túnica albugínea, um fragmento de 0,03 a 0,05g foi obtido do terço médio do parênquima testicular, evitando-se a *rede testis*. As células testiculares foram obtidas mediante cortes sucessivos do fragmento até a obtenção de uma massa homogênea em uma solução aquosa, contendo 100mM de ácido cítrico e 0,5% (v:v) de tween 20. A mistura foi agitada durante 20 minutos, filtrada e corada com 5µg de iodeto de propídio (PI) após adição de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 400mM (na proporção de 5µg de PI para 4mL da solução de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Após 30 minutos de incubação no escuro, a análise foi realizada em Citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, laser de 488nm, FL1 detector 530/30BP, FL2 detector 585/42BP e FL3 detector 670/LP) com um software Becton Dickinson - CellQuest 3.0. O percentual de células haplóides (1C: espermátides e espermatozóides), células diplóides (2C: espermatogônia, preleptóteno, espermátócitos secundários e células somáticas) e de células tetraplóides (4C: todas as células na fase G2 do ciclo da mitose, principalmente espermátócitos primários) foi determinado por análise citométrica e utilizadas para a caracterização da transformação espermatogênica total (1C:2C) e dos espermátócitos primários em espermátides (1C:4C). Um total de 50 mil eventos foi avaliado para cada amostra.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados são apresentados como média ± EPM. Comparações entre as médias dos grupos de morfologia espermática, normospermia (≥60%) e teratospermia (<60%), foram feitas mediante Teste-t de *Student* para amostras não pareadas. As correlações Pearson entre as variáveis foram calculadas. Todas as análises foram feitas com o programa STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa, OK), com nível de significância de 5%.

### I 3. RESULTADOS

Com base na análise da morfologia espermática, 32 amostras de espermatozóides foram classificadas como normospérmicas e 17 como teratospérmicas. Esta classificação foi utilizada, portanto, para analisar todos os demais resultados, os quais são apresentados em média por grupo normospérmico ou teratospérmico.

#### 3.1 PESO CORPORAL, BIOMETRIA TESTICULAR E PARÂMETROS FÍSICOS DOS ESPERMATOZÓIDES.

O peso corporal dos animais variou entre 2,5 e 5,3Kg, com uma média ( $\pm$ EPM) de  $3,8 \pm 0,17$ Kg naqueles com amostras normospérmicas e  $3,71 \pm 0,16$ Kg naqueles com amostras teratospérmicas, sem diferença significativa entre os grupos. Do mesmo modo, não foi detectada diferença significativa para o volume testicular total e o índice gonadossomático (IGS). Entretanto, diferença significativa foi observada na porcentagem de água no testículo, sendo maior no grupo teratospérmico em comparação com o normospérmico. Nos parâmetros físicos dos espermatozóides, nenhuma diferença estatística significativa foi observada entre os grupos. Os dados estão resumidos na Tabela 1.

Analisando as correlações entre as variáveis, verificou-se que o volume testicular e o IGS apresentaram correlação significativa com a concentração intratesticular de  $17\beta$ -estradiol ( $r= 0,47$  e  $r= 0,50$ , respectivamente).

Tabela 1. Volume testicular, índice gonadossomático e dados de avaliação física dos espermatozóides do epidídimo de gatos domésticos, em amostras classificadas como normospérmicas (n= 32) ou teratospérmicas (n= 17).

Parâmetros	Normospérmicos	Teratospérmicos
	Média ± EPM	Média ± EPM
Motilidade espermática (%)	75,78 ± 2,82	77,35 ± 2,94
Vigor espermático (0 – 5)	3,53 ± 0,09	3,26 ± 0,14
Percentual de água testicular (%)	81,71 ± 0,44*	83,06 ± 0,31*
Volume Testicular total (mL)	3,64 ± 0,14	3,68 ± 0,11
Índice Gonadossomático (%)	0,10 ± 0,003	0,10 ± 0,004
Total de espermatozóides (x 10 <sup>6</sup> células)	56,81 ± 7,11	47,85 ± 9,82
Índice de motilidade espermática (IME) (%)	73,20 ± 2,08	71,32 ± 2,56

IME: Índice de motilidade espermática= [% motilidade + (20 x vigor)]/2

\* Indica diferença significativa entre as médias (p≤0,05).

### 3.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.

As amostras teratospérmicas apresentaram maior percentual médio tanto de defeitos primários quanto de secundários. Entre os defeitos primários, diferenças significativas entre os dois grupos foram observadas somente para a porcentagem de acrossoma anormal, enquanto que para os defeitos secundários, os percentuais de peça intermediária e de cauda dobrada, ambas com gotas, predominaram, sendo maiores nas amostras teratospérmicas (Tabela 2). O percentual de acrossoma anormal foi positiva e significativamente correlacionado com a concentração intratesticular de estradiol por testículo (r= 0, 44).

O percentual de defeitos secundários foi correlacionado significativamente com o total de espermatozóides do epidídimo (r= 0,35) e com o número total de células de Sertoli (r= 0,42). Coeficiente de correlação significativo foi observado também entre a porcentagem das anormalidades espermáticas primárias e a concentração intratesticular de 17β-estradiol (r= 0,51).

Tabela 2. Percentual médio ( $\pm$ EPM) de espermatozoides morfologicamente normais e anormais de gatos domésticos em amostras classificadas como normospérmicas e teratospérmicas.

Parâmetros	Normospérmicos (n=32)	Teratospérmicos (n=17)
Espermatozoides normais (%)	75,27 $\pm$ 1,89	46,19 $\pm$ 1,58**
Defeitos espermáticos (%)	24,74 $\pm$ 1,89	53,81 $\pm$ 1,58**
Defeitos primários (%)	6,70 $\pm$ 0,98	11,98 $\pm$ 1,52**
Macrocefalia	0,78 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,20
Microcefalia	0,65 $\pm$ 0,11	0,49 $\pm$ 0,003
Bicefálico	1,10 $\pm$ 0,16	0,70 $\pm$ 0,12
Acrossoma anormal	2,95 $\pm$ 0,56	8,32 $\pm$ 1,61**
Peça intermediária anormal	1,44 $\pm$ 0,28	1,12 $\pm$ 0,19
Peça Intermediária ausente	1,77 $\pm$ 0,71	1,11 $\pm$ 0,62
Cauda fortemente enrolada	2,92 $\pm$ 0,80	1,90 $\pm$ 0,39
Defeitos secundários (%)	18,04 $\pm$ 1,57	41,83 $\pm$ 1,90*
Peça intermediária dobrada com gota	5,06 $\pm$ 0,79	10,57 $\pm$ 1,58**
Peça intermediária dobrada sem gota	1,25 $\pm$ 0,20	1,16 $\pm$ 0,34
Cauda dobrada com gota	7,33 $\pm$ 1,41	21,92 $\pm$ 2,38**
Cauda dobrada sem gota	2,38 $\pm$ 0,40	2,46 $\pm$ 0,49
Gota citoplasmática proximal (GCP)	4,36 $\pm$ 0,70	6,61 $\pm$ 1,65
Gota citoplasmática distal (GCD) §	50,96 $\pm$ 2,96	36,52 $\pm$ 1,75**
Pescoço dobrado	1,16 $\pm$ 0,45	0,55 $\pm$ 0,07

§ Apesar de mostrados os percentuais, as GCD não foram consideradas no cálculo de células com defeitos.

\* Indica diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).

\*\* Indica diferença significativa entre as médias ( $p < 0,01$ ).

### 3.3 CONCENTRAÇÃO SÉRICA E INTRATESTICULAR DE TESTOSTERONA E 17 $\beta$ -ESTRADIOL

As concentrações sérica e intratesticular de testosterona e plasmática de 17 $\beta$ -estradiol não diferiram significativamente entre as amostras normospérmicas e teratospérmicas. Porém, foram observadas diferenças significativas nas

concentrações intratesticulares de  $17\beta$ -estradiol entre os dois grupos bem como na proporção intratesticular de testosterona/ $17\beta$ -estradiol. As médias ( $\pm$ EPM) por grupo são apresentadas na Tabela 3.

Algumas correlações significativas foram encontradas entre as concentrações sérica e intratesticular de testosterona e  $17\beta$ -estradiol com as demais variáveis estudadas. A concentração intratesticular de  $17\beta$ -estradiol foi positivamente correlacionada com a proporção de lume tubular ( $r= 0,31$ ). A proporção intratesticular de testosterona/ $17\beta$ -estradiol apresentou correlação negativa com a porcentagem de células diplóides ( $r= -0,32$ ), porcentagem de apoptose celular ( $r= -0,4$ ) e positiva com o índice de transformação espermática total ( $r= 0,36$ ), índice meiótico ( $r= 0,4$ ) e número de espermatogônia A no estágio 1 ( $r= 0,40$ ).

Tabela 3. Concentração sérica e intratesticular de testosterona e  $17\beta$ -estradiol em amostras de gatos domésticos, classificadas como normospérmicas ou teratospérmicas.

Parâmetros	n	Normospérmicos	n	Teratospérmicos
		Média $\pm$ EPM		Média $\pm$ EPM
Testosterona sérica (ng/mL)	28	0,49 $\pm$ 0,09	16	0,72 $\pm$ 0,30
$17\beta$ -estradiol sérico (pg/mL)	28	10,58 $\pm$ 1,30	17	12,12 $\pm$ 1,85
Testosterona intratesticular ( $\mu$ g/testículo)	32	0,85 $\pm$ 0,11	16	0,77 $\pm$ 0,18
$17\beta$ -estradiol intratesticular (ng/testículo)	31	10,16 $\pm$ 1,11**	12	16,38 $\pm$ 1,88**
Proporção testosterona/ $17\beta$ -estradiol intratesticular (ng/testículo)	31	85,99 $\pm$ 10,54*	12	45,03 $\pm$ 15,26*

\* Indica diferença significativa entre as médias ( $p<0,05$ ).

\*\* Indica diferença significativa entre as médias ( $p<0,01$ ).

### 3.4 ESPERMATOGÊNESE POR HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR

A análise morfométrica dos testículos não revelou diferença significativa entre as amostras normospérmicas e teratospérmicas em quaisquer dos parâmetros morfométricos analisados (diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, comprimento tubular total, volume testicular líquido e proporções volumétricas dos diferentes componentes do parênquima testicular), conforme Tabela 4.

Do mesmo modo, a população total de células de Sertoli e de Leydig por grama de testículo foi similar nos dois grupos (Tabela 5). Além disso, nas células de Leydig, não se observou diferença significativa na proporção nuclear (%) e citoplasmática (%), nem no volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ ) ou celular de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ) entre amostras normospérmicas e teratospérmicas. Entretanto, diferença significativa foi observada em relação ao volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ ), o qual foi maior nas amostras normospérmicas.

A produção espermática diária (PED) por grama de testículo foi similar entre o grupo normospérmico ( $24,32 \pm 1,43$  milhões) e teratospérmico ( $22,03 \pm 1,1$  milhões) e nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos para os índices de rendimento intrínseco da espermatogênese, tais como: índice de células Sertoli por células germinativas totais, índice de célula de Sertoli por espermátides arredondadas, coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial e índice meiótico (Tabela 6). Com base nestes dados os dois grupos mostraram um índice de apoptose celular de 27% durante as duas divisões meióticas.

Analisando as correlações entre as variáveis, observou-se que o diâmetro tubular foi significativa e positivamente correlacionado com o número de espermatócitos paquíteno ( $r= 0,31$ ) e de espermátides arredondadas no estágio 1 ( $r= 0,36$ ) e com o número de células germinativas ( $r= 0,44$ ) e negativamente com a população total de célula Sertoli ( $r= -0,69$ ). O comprimento tubular total foi positivamente correlacionado com a população total de células de Sertoli ( $r= 0,79$ ), e com a produção espermática diária (PED) por grama de testículo ( $r= 0,62$ ). Já a PED apresentou correlações significativas positivas com o número total de espermátides arredondadas no estágio 1 ( $r= 0,42$ ) e com o índice meiótico ( $r= 0,30$ ).

Tabela 4. Dados morfométricos do testículo de gatos domésticos com amostras normospérmicas (n= 31) e teratospérmicas (n= 16). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

Parâmetros	Normospérmicos	Teratospérmicos
	Média ± EPM	Média ± EPM
Volume testicular líquido (mL)	1,46 ± 0,05	1,52 ± 0,44
Proporção dos componentes do parênquima testicular (%)		
Túbulo seminífero	83,18 ± 0,72	83,13 ± 0,75
Túnica Própria	4,67 ± 0,14	4,67 ± 0,23
Epitélio seminífero	73,16 ± 0,72	72,98 ± 0,92
Lume tubular	5,26 ± 0,28	5,54 ± 0,44
Compartimento intertubular		
Células de Leydig	5,15 ± 0,21	5,05 ± 0,25
Tecido conjuntivo	2,48 ± 0,20	2,59 ± 0,21
Vasos sanguíneos	1,00 ± 0,07	0,86 ± 0,07
Tecido linfático	8,39 ± 0,69	8,31 ± 0,61
Diâmetro tubular (µm)	219,03 ± 3,87	214,92 ± 4,36
Altura do epitélio seminífero (µm)	84,53 ± 1,20	81,92 ± 2,07
Comprimento Tubular total (m) por testículo	34,02 ± 1,94	34,08 ± 2,05

### 3.5 ESPERMATOGÊNESE POR CITOMETRIA DE FLUXO

A análise por citometria de fluxo revelou um maior percentual de células haplóides e de transformação espermatogênica total nas amostras normospérmicas em relação às teratospérmicas, sendo que estas últimas, por sua vez, apresentaram um maior percentual de células diplóides. Os valores médios (± EPM) por grupo são apresentados na Tabela 7.

Tabela 5. Morfometria das células de Sertoli e de Leydig em testículos de gatos domésticos classificados como normospermicos ou teratospermicos, segundo a morfologia dos espermatozoides da cauda do epidídimo (média  $\pm$  EPM).

Parâmetro	Normospermicos (n= 31)	Teratospermicos (n= 16)
Volume Célula Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	1321,54 $\pm$ 71,34	1166,59 $\pm$ 44,18
Volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ )	848,68 $\pm$ 55,14	889,33 $\pm$ 355,68
Volume Nuclear Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	472,86 $\pm$ 21,65**	396,03 $\pm$ 14,03**
Número células Leydig por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	45,38 $\pm$ 3,62	42,87 $\pm$ 3,99
População de célula de Sertoli por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	55,14 $\pm$ 4,43	54,27 $\pm$ 3,58

\*\* Indica diferença significativa entre as médias ( $p < 0,01$ ).

TABELA 6. Dados histomorfométricos de produção espermática diária e índices de rendimento intrínseco da espermatogênese de gatos domésticos classificados como normospermicos ou teratospermicos, segundo a morfologia dos espermatozoides da cauda do epidídimo (média  $\pm$  EPM). Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos.

Parâmetros	Normospermicos (n= 31)	Teratospermicos (n= 16)
	Média $\pm$ EPM	Média $\pm$ EPM
Produção espermática diária total (PED) ( $\times 10^6$ )	34,63 $\pm$ 1,86	33,58 $\pm$ 2,25
Índice de célula de Sertoli por células germinativas	7,46 $\pm$ 0,42	6,50 $\pm$ 0,29
Índice de célula de Sertoli por espermátides arredondadas	5,10 $\pm$ 0,32	4,39 $\pm$ 0,24
Coeficiente de mitoses espermatogoniais (EPL/Gonia A)*	11,02 $\pm$ 1,80	12,73 $\pm$ 1,79
Índice meiótico (EAr/EPQ)**	2,89 $\pm$ 0,11	2,91 $\pm$ 0,14

\* - EPL/Gonia A: espermátócitos preleptóteno por espermatogônias A.

\*\* - EAr/EPQ: espermátócitos paquíteno por espermátides arredondadas.



Tabela 7. Proporções de células haplóides, diplóides e tetraplóides, transformação espermatogênica total e índice meiótico, obtidos por análise citométrica de testículos de gatos domésticos classificados como normospérmicos ou teratospérmicos, segundo a morfologia dos espermatozóides da cauda do epidídimo (média  $\pm$  EPM).

Parâmetros	Normospérmicos (n= 31)	Teratospérmicos (n= 16)
	Média $\pm$ EPM	Média $\pm$ EPM
Células haplóides (1C)	53,28 $\pm$ 0,90*	50,03 $\pm$ 1,24*
Células diplóides (2C)	25,84 $\pm$ 0,64**	30,50 $\pm$ 1,18**
Células tetraplóides (4C)	18,16 $\pm$ 0,56	17,12 $\pm$ 0,50
Transformação espermatogênica total (1C:2C)	2,12 $\pm$ 0,08**	1,69 $\pm$ 0,09**
Índice meiótico (1C:4C)	3,06 $\pm$ 0,14	2,97 $\pm$ 0,14

\* Indica diferença significativa entre as médias ( $p < 0,05$ ).

\*\* Indica diferença significativa entre as médias ( $p < 0,01$ ).

## I 4. DISCUSSÃO

O presente estudo é, para nosso conhecimento, a primeira descrição das concentrações intratesticular de 17 $\beta$ -estradiol em gatos domésticos bem como a primeira demonstração de uma potencial ligação entre o balanço testosterona/estradiol intratesticular com a morfologia espermática nos felinos. Os achados mais relevantes deste estudo incluem concentrações significativamente mais altas de estradiol, acompanhadas de uma proporção significativamente mais baixa entre testosterona e estradiol intratesticulares associadas com amostras teratospérmicas de espermatozóides de epidídimo de gatos domésticos. O percentual de formas espermáticas anormais, como o de células com defeitos de acrossoma, considerado um defeito primário, foi correlacionado positivamente com a concentração intratesticular de estradiol, sugerindo que a perda do equilíbrio entre androgênios e estrogênios pode alterar as condições ótimas para a espermatogênese e/ou maturação epididimária, comprometendo a qualidade espermática.

Apesar da concentração sérica de 17 $\beta$ -estradiol encontrada nos gatos deste estudo estar dentro da faixa de variação descrita para os machos de várias espécies (WAITES; EINER-JENSEN, 1974; OVERPECK *et al.*, 1978; BUJAN *et al.*, 1993; HESS *et al.*, 2000), a concentração intratesticular de estradiol de gatos foi maior do que aquela descrita para o fluido da rede testicular de algumas espécies animais (FREE; JAFFE, 1979; WAITES; EINER-JENSEN, 1974; GANJAM; AMANN, 1976), bem como para o plasma seminal humano (BUJAN *et al.*, 1993) e de outras espécies (GANJAM; AMANN, 1976; CLAUS *et al.*, 1985; CLAUS *et al.*, 1992). Estas diferenças podem tanto ser espécie-específicas, como, por exemplo, os altos níveis observados em machos eqüinos (CLAUS *et al.*, 1992) como apenas decorrentes de diferenças na técnica de dosagem utilizada.

Quando comparados os dois grupos deste estudo, a maior concentração intratesticular de 17 $\beta$ -estradiol encontrada nos gatos com amostras teratospérmicas, nos leva a aventar a hipótese de que a concentração de estradiol intratesticular, bem como a relação entre a testosterona e o estradiol intratesticulares estejam envolvidas na patofisiologia da teratospermia dos felinos, seja ela ocasional ou persistente. Sabe-se, de estudos com humanos e com células testiculares *in vitro* de

animais, que o estradiol intratesticular em alta concentração é capaz de inibir diretamente a esteroidogênese nas células de Leydig maduras (BARTKE *et al.*, 1977; AMADOR *et al.*, 1989; MURPHY *et al.*, 1980; ver revisão ABNEY, 1999) e que esta capacidade parece estar associada à redução do número de sítios de ligação para o LH nas células de Leydig e à inibição de enzimas envolvidas na síntese de testosterona (ABNEY, 1999), não sendo necessariamente efeitos mediados por receptores para estrógenos. Este efeito também foi observado no estudo realizado por D'Souza *et al.* (2005), o qual revelou que a administração exógena de 17 $\beta$ -estradiol para ratos, na dose de 100 $\mu$ g/Kg/dia, foi capaz de aumentar a concentração de estradiol intratesticular e, ao mesmo tempo, reduzir as concentrações intratesticular de testosterona e sérica de FSH sem alterar a concentração sérica de LH.. No nosso estudo, entretanto, a maior concentração de estradiol intratesticular não foi acompanhada de redução significativa da testosterona intratesticular nos animais teratospérmicos, apesar de uma tendência a valores mais baixos, conforme já descrito anteriormente (NEUBAUER *et al.*, 2004). Esta redução, ainda que não significativa, contribuiu para a menor proporção T:E nos animais teratospérmicos, sugerindo uma participação deste desequilíbrio entre androgênios/estrogênios no ambiente do testículo e/ou epidídimo no aumento do percentual de espermatozóides morfologicamente anormais nos gatos domésticos.

Neste contexto, concentrações elevadas de estradiol foram detectadas no testículo de pacientes humanos oligoteratoastenozoospérmicos e oligozoospérmicos em comparação com pacientes normozoospérmicos (BUJAN *et al.*, 1993; LUBISHITZKY *et al.*, 2002). Também no plasma seminal, concentrações aumentadas de estradiol e diminuída de testosterona foram encontradas em pacientes humanos azoospérmicos (ZHANG *et al.*, 2010), indicando que a proporção hormonal entre estes hormônios pode ser um indicador de fertilidade masculina. Entretanto, não se sabe, até o momento, como a concentração aumentada de estradiol no plasma seminal e no testículo pode levar à deterioração dos parâmetros morfológicos e físicos dos espermatozóides em seres humanos ou felinos.

A teratospermia também tem sido relatada em modelos de animais transgênicos *knockout* ER $\alpha$  (BUJAN *et al.*, 1993; JOSEPH *et al.*, 2010a), os quais apresentam elevada concentração de estradiol, porém não os seus efeitos mediados via receptores clássicos. A ausência dos ER $\alpha$  e, portanto, da ação estrogênica normal resulta em inadequada reabsorção de fluido nos ductos eferentes e região

proximal do epidídimo, gerando seu refluxo e acúmulo no lúmen da *rete testis* e túbulos seminíferos. Nesta condição, o epidídimo torna-se incapaz de regular adequadamente o fluido luminal de modo a permitir a aquisição normal de função e viabilidade espermáticas, resultando na ocorrência de defeitos espermáticos principalmente relacionados à cauda, como flagelo fortemente enrolado ou dobra, normalmente junto à gota citoplasmática (JOSEPH *et al.*, 2010a). No nosso estudo os defeitos de angulação de cauda e peça intermediária, associados à gota citoplasmática, foram os defeitos secundários com maiores percentuais de ocorrência nas amostras teratospérmicas, concordando com dados prévios para gatos teratospérmicos (HOWARD *et al.*, 1990; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; 2002; NEUBAUER *et al.*, 2004), sugerindo uma maior sensibilidade dos espermatozóides a mudanças na osmolalidade ao serem misturados com os fluidos prostático durante a ejaculação ou nos meios utilizados *in vitro* para recuperação dos espermatozóides da cauda do epidídimo. Além das dobras, a gota citoplasmática distal (GCD), ocorreu na maioria das células, como esperado para amostras de epidídimo. Como as GCD são normalmente perdidas durante a ejaculação, os espermatozóides com GCD são aptos a competir pela fertilização (AXNÉR *et al.*, 1998; 1999; 2006; AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2007), porém, aquelas com dificuldade em perder as gotas, seja pela ocorrência das dobras ou outro mecanismo, juntamente com o que apresentam persistência da gota citoplasmática proximal (GCP) apresentam sua capacidade fecundante comprometida (AXNÉR *et al.*, 2006). O percentual de GCP, semelhante ao descrito tanto para ejaculados como amostras de epidídimo (HOWARD *et al.*, 1990; AXNÉR *et al.*, 1998; TEBET *et al.*, 2006), também foi maior nas amostras teratospérmicas. Dentre os defeitos primários, houve maior percentual de acrossoma anormal nas amostras teratospérmicas, como descrito para epidídimo (AXNÉR *et al.*, 2004; TEBET *et al.*, 2006) e gatos teratospérmicos (PUKAZHENTHI *et al.*, 2002).

Como a expressão de receptores para estrogênio não foi mensurada no presente estudo, não podemos discutir os dados de morfologia em relação a uma maior ou menor ação do estradiol no testículo e epidídimo, nem tampouco se os níveis elevados de estradiol nas nossas amostras estão associados com uma redução de receptores. Entretanto, ainda que não tenha sido uma correlação forte, a concentração intratesticular de estradiol teve correlação positiva com o percentual de defeitos primários, sugerindo a ocorrência de alterações no ambiente testicular

em função da baixa proporção T:E, sejam diretamente nas células tubulares ou indiretamente, como consequência de alterações no ambiente do fluido luminal. Curiosamente, as amostras teratospérmicas deste estudo apresentaram também um maior percentual de água no testículo. Obviamente, não podemos excluir a possibilidade de que outras variáveis estejam relacionadas com o maior percentual de defeitos espermáticos nos indivíduos das amostras teratospérmicas, tais como fatores genéticos e nutricionais, os quais não foram monitorados ou controlados em nosso estudo.

Além da morfologia, reduções no índice de apoptose parecem estar associadas ao aumento do estradiol testicular de modo dose-dependente (BUJAN *et al.*, 1993; ABNEY, 1999; KULA *et al.*, 2001; D'SOUZA *et al.*, 2005). Em gatos domésticos teratospérmicos, apesar de não haver informação sobre o nível de estradiol intratesticular, o índice de apoptose celular é 15% menor quando comparado com animais normospérmicos (NEUBAUER *et al.*, 2004; JEWGENOW *et al.*, 2009), o que leva a um maior percentual de células haplóides, maior índice de transformação espermatogênica total e uma produção espermática 177% maior nos indivíduos teratospérmicos (NEUBAUER *et al.*, 2004). No nosso estudo, não foi observada diferença no índice de apoptose entre os dois grupos, porém detectou-se uma fraca correlação negativa entre a proporção intratesticular de testosterona/17 $\beta$ -estradiol e o índice de apoptose celular, sugerindo um possível efeito do estradiol como antiapoptótico em alguns dos indivíduos do nosso estudo. Entretanto, ao contrário do esperado, na análise citométrica da espermatogênese, demonstrou-se um menor percentual de células haplóides e maior percentual de células diplóides nas amostras teratospérmicas, ainda que os dados histomorfométricos de produção espermática diária tenham sido similares entre os dois grupos. Isto está de acordo com o reportado por Jewgenow *et al.* (2009) para amostras teratospérmicas “ocasionais”, como as por nós avaliadas, as quais apresentam maior percentual de células diplóides com menor produção espermática. Adicionalmente, as correlações positivas entre a proporção intratesticular de testosterona/17 $\beta$ -estradiol com os índices de transformação espermática total (células haplóides:células diplóides) e meiótico (Espermatócito Paquíteno:Espermátide Arredondada) e com o número de espermatogônia A no estágio 1 do ciclo, de um certo modo, demonstram que o equilíbrio entre estes hormônios parece ser imprescindível para o funcionamento adequado da espermatogênese (SHARPE, 1998; NIE *et al.*, 2002).

Em avaliações histomorfométricas da espermatogênese, observou-se que o aumento induzido da concentração de estradiol testicular resultou na retenção das espermátides nos estágios IX-XI, independente da dose administrada, e falência destas espermátides em sofrerem espermição no estágio VIII, na dose mais alta de estradiol (D'SOUZA *et al.*, 2005). Nossos resultados da morfometria testicular, entretanto, não revelaram diferenças entre os dois grupos, estando de acordo com o observado também em felinos normospermicos e teratospermicos (NEUBAUER *et al.*, 2004). De modo geral, os dados histomorfométricos são muito similares àqueles descritos na literatura (FRANÇA; RUSSELL, 1998; GODINHO, 1999; FRANÇA; GODINHO, 2003; NEUBAUER *et al.*, 2004; SIEMIENIUCH; WOCLAWEK-POTOCKA, 2007). Uma única exceção por nós observada foi um menor volume nuclear médio das células de Leydig nas amostras teratospermicas. Isto poderia indicar um menor grau de atividade destas células nos indivíduos teratospermicos, porém esta hipótese permanece ainda para ser confirmada, inclusive se há qualquer relação desta redução com a maior concentração intratesticular de estradiol. De modo geral, os resultados da espermatogênese obtidos com a citometria de fluxo e histomorfometria, corroboraram os achados de avaliação física e morfológica da suspensão espermática epididimária, sendo similares aqueles citados por Neubauer *et al.* (2004) e demonstram que a espermatogênese nos gatos com teratospermia “ocasional” é menos eficiente do que o mesmo processo nos felinos com teratospermia persistente.

Em conclusão, apesar das diferenças nos protocolos experimentais e na forma de classificar as amostras quanto à teratospermia, a análise da morfologia espermática das amostras de epidídimo utilizadas neste estudo revelou alterações morfológicas similares àquelas descritas para indivíduos teratospermicos persistentes. Mesmo considerando que os dados por nós obtidos representam um momento isolado na vida reprodutiva do animal, não necessariamente refletindo a função testicular do mesmo momento, acreditamos que os resultados aqui apresentados podem contribuir para a elucidação da gênese da teratospermia nos felinos (HOWARD *et al.*, 1990; PUKAZHENTHI *et al.*, 2000; 2002). Por exemplo, os dados permitiram detectar, pela primeira vez, que níveis mais elevados de estradiol intratesticular, acompanhados de uma redução na proporção T:E intratesticular, foram associados de modo significativo a uma maior ocorrência de formas espermáticas anormais. Ainda que pelas demais variáveis estudadas os animais do

presente estudo não possam ser classificados como verdadeiros teratospérmicos, a confirmação desta relação entre uma baixa proporção T:E em amostras teratospérmicas ocasionais pode indicar um componente endócrino importante na gênese da teratospermia nos felinos. Os mecanismos testiculares e epididimários envolvidos neste processo, entretanto, ainda precisam ser elucidados.

## I 5. BIBLIOGRAFIA

ABNEY, T.O. The potential of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. **Steroids**, v.64, p.610-617, 1999.

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **Anatomie Research**, v. 94, p. 238-248, 1946.

AMADOR, A.G., ESQUIFINO, A.I., BARTKE, A. *et al.* Effects of diethylstilbestrol on testicular function and luteinizing hormone receptors. **Revista Española de Fisiología**, v. 45, p. 245-254, 1989.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal of Dairy Science**, v.45, p.774-781, 1962.

ASLAM, H., ROSIEPEN, G., KRISHNAMURTHY, E. *et al.* The cycle duration of the seminiferous epithelium remains unaltered during GnRH antagonist-induced testicular involution in rats and monkeys. **Journal of Endocrinology**, v. 161, p. 281-288, 1999.

AXNÉR, E., STRÖM HOLST, B., LINDE-FORSBERG, C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. **Theriogenology**, v.50, p.973-979, 1998.

AXNÉR, E., LINDE-FORSBERG, C., EINARSSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**, v.52, p.767-778. 1999.

AXNÉR, E., PUKAZHENTHI, B.S., WILDT, D.E. *et al.* Creatine phosphokinase in domestic cat epididymal spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, p. 265-270, 2002.

AXNÉR, E., HERMANSSON, U., LINDE-FORSBERG, C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Animal of Reproduction Science**, v.84 (1-2), p.179 – 191, 2004.

AXNÉR, E., LINDE FORSBERG, C. Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 42, p. 282-291, 2007.

BARTKE, A.; WILLIAMS, K.H.; BALTERIO, S. Effects of estrogens on testicular testosterone production in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 17, p. 645-649, 1977.

BILINSKA, B., SCHMALZ-FRACZEK, B., KOTULA, M. *et al.* Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, p. 189-198, 2001.



BLANCO-RODRÍGUEZ, J. DNA replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the cat. **Journal of Andrology**, v. 23, n.4, p. 484-490, 2002.

BLOTTNER, S., JEWGENOW, K. Moderate Seasonality in testis function of domestic cat. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 42, p. 536-540, 2007.

BRINSKO, S.P. Fisiologia reprodutiva do macho. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.399-405.

BUJAN, L., MIEUSSET, R., AUDRAN, F. *et al.* Increased oestradiol level in seminal plasma in infertile men. **Human Reproduction**, v. 8, p. 74-77, 1993.

CARREAU, S., GENISSEL, C., BILINSKA, B. *et al.* Topical review sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. **International Journal of Andrology**, v.22, p.211-223, 1999.

CARREAU, S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, p.65-72, 2001.

CARREAU, S., BOURGUIBA, S., LAMBARD, S. *et al.* Reproductive system: aromatase and estrogens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.193, p.137-143, 2002.

CARREAU, S., DELALANDE, C., SILANDRE, D. *et al.* Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, p.65-68, 2006.

CLAUS, R., SCHOPPER, D., HOANG-VU, C. Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. **Acta of Endocrinology**, v. 109, p. 281-288, 1985.

CLAUS, R., DIMMICK, M.A., GIMENEZ, T. *et al.* Estrogens and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  in the semen and blood plasma of stallions. **Theriogenology**, v. 38, p. 687-693, 1992.

DANZO, B.J., ELLER, B.C. The presence of a cytoplasmic estrogen receptor in sexually mature rabbits epididymides: comparison with the estrogen receptor in immature rabbit epididymal cytosol. **Endocrinology**, v.105, p. 1128-1134, 1979.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. **Monatshefte für Veterinärmedizin**, v.29, p. 650-652, 1974.

D'SOUZA, R., GILL-SHARMA, M.K., PATHAK, S. *et al.* Effects of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 241, p. 41-48, 2005.

EDDY, E.M., WASHBURN, T.F., BUNCH, D.O. *et al.* Targeted disruption of the estrogen receptor gene in the male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**, v. 137, p. 4796-4805, 1996.

FISHER, J.S., TURNER, K.J., FRASER, H.M. *et al.* Immunoexpression of aquaporin-1 in the efferent ducts of the rat and marmoset monkey during development, its

modulation by estrogens, and its possible role in fluid resorption. **Endocrinology**, v.139, p.3935-3945, 1998.

FOSTER, P.M. Testicular organization and biochemical function. In: LAMB, J.C. **Physiology and Toxicology of Male Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1988. p.7-34.

FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: **Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**; 1992; The Hague, v.4,p. 1716-1718.

FRANCA, L.R., OGAWA, T., AVARBOCK, M.R. *et al.* Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 59, p.1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R. RUSSEL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J. MARTINEZ-GARCIA, F. **Male Reproduction: a multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone: Madrid, 1998, p. 197-219.

FRANÇA, R.L.; SILVA J.R., CHIARINI-GARCIA, H. *et al.* Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1629-1636, 2000.

FRANÇA, L.R., GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). **Biology and Reproduction**, v. 68, p. 1554-1561, 2003.

FREE; M.J., JAFFE, R.A. Collection of rete testis fluid from rats without previous efferent duct ligation. **Biology of Reproduction**, v. 99, p. 1618-1630, 1979.

GANJAM, V.K., AMANN, R.P. Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions. **Endocrinology**, v. 99, p. 1618-1630, 1976.

GARNER, D.L., HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 1988. p.187-211.

GODINHO, C.L. **Análise histomorfométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (Felis domestica) sexualmente maduros**. Minas Gerais, 1999. 123p. Tese de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

GOYAL, H.O., BARTOL, F.F., WILEY, A.A. *et al.* Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. **Anatomy Research**, v. 249, p.54-62, 1997.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. 11<sup>th</sup> edition. Saunders, 2006. 1152p.

HAN, Y.; FENG, H.L.; SANDLOW, J.I. *et al.* Comparing expression of progesterone and estrogen receptors in testicular tissue from men with obstructive and nonobstructive azoospermia. **Journal of Andrology**, v. 30, n. 2, p.127-133, 2009.

HESS, R.A.; GIST, D.H.; BUNICK, D. *et al.* Estrogen receptor ( $\alpha$  e  $\beta$ ) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. **Journal of Andrology**, v.18, p.602-611, 1997a.

HESS, R.A.; BUNICK, D.; LEE, K. *et al.* A role for oestrogens in the male reproductive system. **Nature**, v.390, n. 6659, p.509-512, 1997b.

HESS, R.A. Spermatogenesis, Overview. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. (Ed.) **Encyclopedia of Reproduction**. Academic Press: New York, 1999. v.2. p. 539-545.

HESS, R.A. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. **Reviews of reproduction**, v. 5, p. 84-92, 2000.

HESS, R.A.; BUNICK, D.; BAHR, J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract – a review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, p. 29-38, 2001.

HESS, R.A. Estrogen in the adult male reproduction tract: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, n. 52, p. 1-14, 2003.

HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; LINCOLN, G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the roe deer, *Cervus elephus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 54, p. 209-213, 1978.

HOWARD, J.G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. **Zoo and wildlife medicine: current therapy** . 3.ed. Philadelphia : W. B. Saunders, 1993. p.390-9.

HOWARD, J.G.; BROWN, J.L.; BUSH, M. *et al.* Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones in improvement of spermatozoid viability and morphology after swim processing. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 204-215, 1990.

IGUSHI, T. ; UESUGUI, Y. ; SATO, T. *et al.* Developmental pattern of estrogen receptor expresión in male Mouse genital organs. **Molecular Andrology**, v.6, p. 109-119, 1991.

JEFFERSON, W.N., COUSE, J.F., BANKS, E.P. *et al.* Expression of estrogen receptor  $\beta$  is developmentally in reproductive tissues of male and female mice. **Biology of Reproduction**, v.62, p.310-317, 2000.

JEWGENOW, K.; NEUBAUER, K.; BLOTTNER, S. *et al.* Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. **Journal of Andrology**, v. 30, n.4, p. 460-468, 2009.

JOHNSON, W.E.; DRATCH, P.A.; MARTENSON, J.S.; O'BRIEN, S.J. Resolution of recent radiations within three evolutionary lineages of Felidae using mitochondrial

restriction fragment length polymorphism variation. **Journal of Mammal Evolution**, v.3, p.97-120, 1996.

JOHNSON, L. ; VARNER, D.D. ; ROBERTS, M.E. *et al.* Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 471-480, 2000.

KERR, J.B. The Cytology of the human testis. In: BURGER, H., KRETZER, D. **The testis**. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press: New York, 1989. p.197-229.

JOSEPH, A.; HESS, R.A.; SCHAEFFER, D.J. *et al.* Absence of estrogen receptor alpha leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 82, n.5, p. 948-957, 2010a.

JOSEPH, A.; SHUR, B.D. ; KO, C. *et al.* Epididymal hypo-osmolarity induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor alpha knockout mouse. **Biology of Reproduction**, v. 82, n.5, p.958-967, 2010b.

KIRKPATRICK, J.F. Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. **Canadian Journal of Zoology**, v. 63, n. 6, p. 1285–1287, 1985.

KULA, K.; WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R.; SLOWIKOWSKA-HILCZER, J. *et al.* Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, p. 89-97, 2001.

KWON, S.; HESS, R.A.; BUNICK, D. *et al.* Estrogen receptors are present in the epididymis of the rooster. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 378-384, 1997.

LEACH, R.B.; MADDOCK, W.O.; TOKUYAMA, I. *et al.* Clinical studies of testicular hormone production. **Recent Progress in Hormone Research**, v.12, p.377-397, 1956.

LEITE, F.L.G.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P. *et al.* Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). **Animal Reproduction Science**. Doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.04.003.

LINDBURG, D.G. ; DURRANT, B.S. ; MILLARD, S.E. *et al.* Fertility assessment of cheetah males with poor quality semen. **Zoo Biology**, v.12, n.1, p.97-103, 1993.

LUBOSHITZKY, R.; SHEN-ORR Z.; NAVE R. *et al.* Melatonin administration alters semen quality in healthy men. **Journal of Andrology**, v. 23, p.572 –578, 2002.

LYU, P.Y.; HANDELSMAN, D.J. The present and the future state of hormonal treatment for male infertility. **Human Reproduction Update**, v.9, n.1, p. 9-23, 2003.

MAHATO, D.; GOULING, E.H.; KORACH, K.S. Spermatogenic Cells Do Not Require Estrogen Receptor- for Development or Function. **Endocrinology**, v. 141, n.3, p.1273-1276, 2000.

MAHATO, D.; GOULING, E.H.; KORACH, K.S. *et al.* Estrogen receptor- $\alpha$  is required by the supporting somatic cells for spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 178, n. 1-2, p. 57-63, 2001.

MORAIS, R.N. **Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758; *Leopardus wiedii*, Schinz, 1821; e *Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775): Sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais**. São Paulo, 2000. 177 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal.

MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F. *et al.* Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). **Theriogenology**, v. 57, p. 2027-2041, 2002.

MURPHY, J.B.; EMMOTT, R.C.; HICKS, L.L. *et al.* Estrogen receptors in human prostate, seminal vesicle, epididymis, testis and genital skin: A marker for estrogens-responsive tissues? **Journal of Clinical Endocrinology**, v. 50, p. 938-948, 1980.

NIE, R.; ZHOU, Q.; JASSIM, E. *et al.* Differential expression of estrogen receptors  $\alpha$  e  $\beta$  in the reproductive tracts of adult male dogs and cats. **Biology and Reproduction**, v. 66, p. 1161-1168, 2002.

NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; BLOTTNER, S. *et al.* Quantity rather than quality in teratospermic males: a histomorphometric and flow cytometric evaluation of spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 71, n.5, p. 1517-1524, 2004.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E. *et al.* Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.22, n.3, p.289-318, 2001.

OVERPECK, J.G.; COLSON, S.H.; HOHMANN, J.R. *et al.* Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and hamsters: a literature survey. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.4, p. 785-803, 1978.

PUKAZHENTHI, B.; NOILES, E.; PELICAN, K. *et al.* Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. **Cryobiology**, v. 40, p. 139-150, 2000.

PUKAZHENTHI, B.S.; WILDT, D.E.; HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 57, p.423-433, 2001.

PUKAZHENTHI, B.; SPINDLER, R.; WILDT, D. *et al.* Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 44, p. 288-300, 2002.

RISBRIDGER, G.P.; KRETZER, D.M. Paracrine Regulation of the testis. In: BURGER, H., KRETZER, D. **The testis**. 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press: New York, 1989. p.255-268.

ROMMERTS, F.F.G. How much androgen is required for maintenance of spermatogenesis? **Journal endocrinology**, v. 116, p.7-9, 1988.

ROSENFELD, C.S., GANJAM, V.K., TAYLOR, J.A. *et al.* Transcription and translation of estrogen receptor-beta in the male reproductive tract of estrogen receptor-alpha knock-out and wild-type mice. **Endocrinology**, v.139, p.2982-2987, 1998.

RUSSELL, L.D., MALONE, J.P., McCURDY, D.S. Effect of microtubule disrupting agents, colchicine and vinblastine, on seminiferous tubule structure in the rat. **Tissue and Cell**, v.13, p. 349-367, 1981.

SAEZ, J.M. Leydig Cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation. **Endocrinology Review**, v. 15, p. 574-626, 1994.

SAUNDERS, P.T.K., SHARPE, R.M., WILLIAMS, K. *et al.* Differential expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. **Molecular Human Reproduction**, v.7, p.227-336, 2001.

SHARPE, R.M., MADDOCK, S., KERR, J.B. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. **American Journal of Anatomy**, v.188, p.3-20, 1990.

SHARPE, R.M. Intratesticular control of steroidogenesis. Review. **Clinical Endocrinology**, v. 33, p. 787-807, 1990.

SHARPE, R.M. The roles of oestrogen in the male. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 9, n.9, p. 371-377, 1998.

SCHÖN, J., NEUMANN, S., WILDT, D.E. *et al.* Localization of oestrogen receptors in the epididymis during sexual maturation of domestic cat. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 44, suppl. 2, p. 294-301, 2009.

SCHÖN, J., BLOTTNER, S. Estrogens are involved in seasonal regulation of spermatogenesis and sperm maturation in roe deer. **General and Comparative Endocrinology**, v. 159, p. 257-263, 2008.

SIEMIENIUCH, M.J., WOCLAWEK-POTOCKA, I. Morphological features of the seminiferous epithelium in cat (*Felis catus*, L. 1758) testes. **Journal of Reproduction and development**, v. 53, n. 5, p. 1125-1130, 2007.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ª ed. Manole: São Paulo, 1999. v2.

SPINDLER, R.E., WILDT, D.E. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. **Biology of Reproduction**, v. 61, p.188-194, 1999.

STABENFELDT, C. J.; CRAGUN, G.H.; ADDIEGO, J.R. *et al.* Relationship of Serum Estradiol and Progesterone Concentrations to the Excretion Profiles of Their Major

Urinary Metabolites as Measured by Enzyme Immunoassay and Radioimmunoassay. **Clinical Chemistry**, v. 37, p. 838-844, 1991.

TEBET, J.M., MARTINS, M.I.M., CHIRINEA, V.H. *et al.* Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, p.1629-32, 2006.

TSUTSUI, T., MURAO, I., KAWAKAMI, E. *et al.* Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during breeding season. **Japanese Journal Veterinary Science**, v. 52, n. 4, p. 801-806, 1990.

WAITES, G.M., EINER-JENSEN, N. Collection and analysis fo rete testis fluid from macaque monkeys. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, p. 505-508, 1974.

WEINBAUER, G.F., SCHUBERT, J., YEUNG, C-H. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone antagonist arrests premeiotic germ cell proliferation but does not inhibit meiosis in the male monkey: a quantitative analysis using 5-bromodeoxyuridine and dual parameter flow citometry. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 156, p. 23-34, 1998.

WILDT, D.E. Endangered species spermatozoa: diversity, research and conservation. In: BARTKE, A. **Functions of somatic cells in the testis**. New York: Springer-verlang Inc.1994, p.1-24.

ZHANG, Q., BAI, Q., YUAN, Y. *et al.* Assessment of seminal estradiol and testosterone levels as predictors of human spermatogenesis. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 215-220, 2010.

ZONDEK, B. Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of stallion. **Nature**, v. 193, p.209-210, 1934.

## **CAPÍTULO II**

### **SCREENING OF THE LIPID COMPOSITION OF EPIDIDYMAL SPERMATOZOA FROM DOMESTIC CATS BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY AND ITS CHOLESTEROL AND PHOSPHATE CONTENTS**

**Colaboradores: Andrei Sousa dos Santos**

**Ângela Reghelin**

**Christiane Franz**

**Daniela Magalhães Ribeiro Garcia,**

**Giulia Rafaela Dainez Sant'Ana,**

**Dr. Jürgen Schiller**

**Dra Karin Müller**

**Katlyn Barp Meyer**

**Kristin Teuber**



## II 1. INTRODUCTION

The lipids of plasma membrane of mammalian spermatozoa are known by its effects on the physico-chemical properties and consequent functional spermatozoa characteristics (GRIZARD *et al.*, 2000). The lipids determine the phase transition temperature and influence on the motility, acrossomal exocytosis and fusogenic properties of the spermatozoa (JONES, 1998; GRIZARD *et al.*, 2000; DE ROBERTS, 2003), as well as on the resistance events during the sperm freezing and thawing (PARKS; LYNCH, 1992; GRIZARD *et al.*, 2000; Pettitt *apud* CEROLINI *et al.*, 2001; PURDY; GRAHAM, 2004). For example, the susceptibility of the mammalian spermatozoa to induced damage during the freezing process has been associated with low levels of cholesterol within the spermatozoal membrane (WHITE *et al.*, 1993).

Changes in cholesterol content on the membrane influence the initial events of sperm capacitation, regulate the permeability, the lateral mobility of integral proteins and acquisition of fertilization ability (DAVIS, 1980). Cholesterol also influences the fluidity of membrane (MARTINEZ; MORROS, 1996; LENZI *et al.*, 2000; APEL-PAZ *et al.*, 2003; DE ROBERTS, 2003), playing a important role on gamete cryopreservation, an important tool for preservation of the 36 species in the family *Felidae*, most of which are rare, endangered or threatened by extinction (HOWARD *et al.*, 1990; PUKAZHENTHI *et al.*, 2001; WILDT, 1994; WILDT *et al.*, 1987).

Sperm membrane lipid composition is unusual and it differentiates from that of somatic cells due its high levels of polyunsaturated fatty acids and plasmalogens and its relatively low cholesterol and phospholipids (PL) ratio ranging from 0.20 and 0.83 depending on the species (CROSS, 1998; JONES, 1998). The lipid content and composition differ among species, individuals, age (Svennerholm, 1968 *apud* EVANS; SETCHELL, 1979a), diet (GLIOZZI *et al.*, 2009; ROOKE *et al.*, 2001; THUWANUT *et al.*, 2008), season (Thorp, 1963 *apud* EVANS; SETCHELL, 1979a) and the technique of semen collection (EVANS; SETCHELL, 1979ab).

The most abundant lipids within sperm membrane are phospholipids (PLPs), including phosphatidylcholine (PLC), phosphatidylethanolamine (PLE), phosphatidylserine (PLS), sphingomyelin (SM) and the phosphatidylinositol (PLI) as the main constituents. Other minor components are phosphatidic acid (PA),

lysophospholipids (LPC or LPE), cardiolipin (CL), glycolipids and sterols. The cholesterol is the most abundant sterol within the sperm membrane (LANGLAIS; ROBERTS, 1985; JONES, 1998).

The plasmalogens represent one subclass of phospholipids with ether bond via either 1-alkyl or 1-alkenyl, present in the form of choline plasmalogen (CP) or ethanolamine plasmalogen (EP) which constitute together 40-50% of the total PL (MARTINEZ; MORROS, 1996; JONES, 1998). Unique oxidation products of choline plasmalogens have been detected within sperm membrane of human, boar (LESSIG *et al.*, 2004), bull and Roe deer by MALDI-TOF mass spectrometry (FUCHS *et al.*, 2009).

Although the lipid membrane composition and the cholesterol and phosphate contents had been shown on a variety of mammalian species such as human, (GRIZARD *et al.*, 2000; LENZI *et al.*, 2000; SCHILLER *et al.*, 2000; SION *et al.*, 2001; LESSIG *et al.*, 2004); bulls (LESSIG *et al.*, 2004), boars (CEROLINI *et al.*, 2001), goat (RANA *et al.*, 1991), ram (SCOTT *et al.*, 1967), blue and silver foxes (MILLER JR. *et al.*, 2005), kangaroo, koala and common wombat (MILLER JR. *et al.*, 2004) and elephants (SWAIN *et al.*, 2000), the first and only study with feline sperm was just recently done. The matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) allowed the differentiation between *ruminantia* and three feline species spermatozoa (FUCHS *et al.*, 2009).

A “fingerprint” of the lipid composition of the ejaculated and epididymal sperm was attained from samples of the domestic cat (*Felis catus*), siberian tiger (*Panthera tigris altaica*) and fosa (*Cryptoprocta ferox*). The results of sperm ejaculated revealed that all samples contained diacyl choline phospholipids with moderately unsaturated fatty acyl residues (mainly  $m/z = 808.6$  e  $810.6$  corresponding to the  $\text{Na}^+$  adducts) and, except in domestic cats, diacyl choline phospholipids with a polyunsaturated fatty acyl residue in the *sn*-2 position of the glycerol backbone ( $m/z = 830.6$  and  $858.6$ ). The samples of the domestic cat were characterized by containing high amounts of diacyl phosphatidylcholine 16:0/18:1 ( $m/z = 782.6$ ) while the samples of other two species were characterized by containing significant amounts of ether lipids ( $m/z = 814.6$  and  $816.6$ ). Plasmalogens could be detected just as marginal contents in samples of feline species (FUCHS *et al.*, 2009). Comparing the epididymal and electroejaculated spermatozoa of domestic cat, the first clearly show the diacyl

phosphatidylcholines with highly unsaturated fatty acyl residues which are missing in the latter samples.

Despite the important contribution of this first study on feline lipid membrane composition, the presence or not of lysolipids species and lipooxidation products as well as the contents of cholesterol and phosphate and the cholesterol and phosphate ratio within sperm membrane of domestic cat are still unknown (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999; AXNÉR, 2006). Furthermore, there is no information on the relationship between sperm lipid composition and testis and/or epididymal function, as assessed by quantitative and qualitative sperm analyses and steroid production by the testis. A detailed characterization of the sperm lipid composition of domestic cats stands out as an important tool for understanding their roles in events that take place from the sperm maturation in the epididymis until to acquisition of fertilizing capacity in the female genital tract, and for the development of appropriate techniques of assisted reproduction (FUCHS *et al.*, 2009).

In this study, we measured the cholesterol and phosphate contents of spermatozoa of the epididymal cauda from domestic cats and carried out a screening of the lipid composition by MALDI-TOF mass spectrometry to verify the presence of lysolipids species and lipooxidation products. In addition, the lipid data here obtained was discussed in relation to its correlation with the reproductive data of a parallel study (MÜLLER *et al.* in preparation) which included evaluation of sperm production and quality, as well as intratesticular testosterone and estradiol levels determination on the same individuals.

## II. 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 CHEMICALS

The matrix for MALDI MS (2,5-dihydroxybenzoic acid - DHB) and (9-AAcridin) as well as all solvents ( $\text{CHCl}_3$  and  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) were obtained in highest commercially available purity from Fluka Feinchemikalen GmbH (Taufkirchen, Germany) and used without further purification. PLs used as reference purposes were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, MA, USA) and used as supplied but diluted with  $\text{CHCl}_3$  to give 1mg/mL solutions. All other chemicals used, unless otherwise stated, were reagent grade (Sigma, St. Louis, MO).

### 2.2 SPERMATOZOA SAMPLES PROCESSING AND EXTRATION

The epididymis were obtained from 71 clinically healthy privately owned domestic cats, with non defined breed, aging from 8–72 months ( $21 \pm 2$  months). Samples were collected from July/2007 to Januar/2009. For orchietomy, general anaesthesia was induced with ketamine (Vetaset, Fort Dodge, France; 20 mg/kg and xilazine (Rompun, Virbac, France; 1.0 mg/kg), and the procedure was performed according to Slatter (1999). Both cauda epididymides were dissected free of visible blood vessels and connective tissues and the epididymal spermatozoa were immediately recovered by fine tissue mincing in a petri dish with Ham's F10 (Cutilab, Campinas, SP) buffered with sodium bicarbonate (pH 7.2) and subsequent filtration through nylon mesh (40 $\mu\text{m}$ ) (AXNÉR *et al.*, 2002).

For morphological analysis an aliquot of sperm suspension was fixed in glutaraldehyde (0.3%; v:v in PBS). The remaining sperm suspension was centrifuged (600 g/ 10 min) at room temperature and after removing the supernatant, 100 $\mu\text{L}$  of Ham's F10 were added. The sample was then evaluated for volume, sperm concentration, sperm percentage of motility, forward progressive motility (scale, 0 to 5; 5 – best) and the spermatozoal motility index (SMI) was calculated (HOWARD *et*

*al.*, 1990; SPINDLER; WILDT, 1999). After that, the sperm pellet in Ham's F-10 was diluted 1:1 with bidestiled water and recentrifuged (600 *g*/ 10 min) and then the sperm pellet was recentrifuged once more in 400 $\mu$ L of bidestiled water. The pellet sediments were finally resuspended in 400  $\mu$ L HEPES buffer (42 samples), which was prepared by dilution of 0.1992g HEPES and 0.8766g NaCl in 100mL of bidestiled water and calibrated to pH 7.4, or NaCl 0.9% (40 samples) and frozen at -20°C until analysis.

Lipid extraction was done according to Bligh; Dyer (1959) with slight modifications: 1.5 ml chloroform/methanol (CHCl<sub>3</sub>/ CH<sub>3</sub>OH, 1:2, v/v) was added to 0.4 mL sperm suspension. Samples were vortexed for 1 min and incubated 30 min at room temperature. Then, 0.5mL CHCl<sub>3</sub> was added and samples were vortexed for 30s. Following the addition of 0.5 mL 40mM acetic acid the samples were vortexed again. After phase separation subsequent to centrifugation (1000 *g*/ 20 min at 4°C), the CHCl<sub>3</sub> phase was collected and the aqueous phase mixed again with 1mL CHCl<sub>3</sub> and vortexed for 1 min. After a second centrifugation (1000 *g*/ 10 min at 4°C), the two chloroform phases obtained were combined. CHCl<sub>3</sub> was then evaporated under a stream of nitrogen and all the samples were stored at -20°C until analysis.

## 2.3 CHOLESTEROL AND PHOSPHATE ANALYSIS

Cholesterol was solubilized by using methyl- $\beta$ -cyclodextrin (56.8 mg of MbCD diluted in 1mL of HBS - C4555, Sigma, Saint Louis, MO) and quantified by a fluorescence-based enzyme assay (Amplex Red Cholesterol Assay Kit A12216, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany). Each value of the standard curve was diluted with 10 $\mu$ L of methyl- $\beta$ -ciclodextrina (50mM) and the final concentrations of standard curve (nMol) were zero, 0.207, 0.414, 0.621, 0.827, 1.034 nMol. Samples with at least  $10 \times 10^6$  spermatozoa ( $n = 62$ ) were diluted with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (as described above) in order to obtain approximately 0.5 nMol of cholesterol in 10 $\mu$ L of sample ( $\sim 1$ nMol of CHO in  $10^6$  sperm cells). The presence of free cholesterol and cholesteryl esters were detected indirectly through quantification of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production with the Amplex Red reagent, which in the presence of horseradish peroxidase reacts with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to produce highly fluorescent resorufin. After preparing the plate, it

was incubated for 30 minutes at 37°C protected from light. The reading was done in a fluorescence reader with absorbance of 535 nm and emission of 590nm, using the program XFLUOR. Each paired sample was determined and the cholesterol content is shown in nMol/10<sup>6</sup> spermatozoa.

Samples with a minimum of 30 x 10<sup>6</sup> sperm cells (n=24) were used to quantify the phosphate contents according to Böttcher *et al.* (1961). Briefly, standards were prepared from a stock solution of phosphate 4mM, corresponding to zero, 20 nMol, 40nMol, 60 nMol, 80nMol and 100nMol. After that, 400 µL of perchloric acid were added into samples and standard and the vials were closed with marbles and incubated in a metal block heated at 200°C for 30 to 120 min until the color of samples and standard solutions became transparent. The vials were cooled in room temperature and 4mL of molybdenum solution was added in each tube, following the addition of 500 µL ascorbic acid 10%. The tubes were vortexed after addition of each solution and again incubated in a metal block heated at 100°C for 10 min. The tubes were then cooled in an ice bath and the absorbance read on a spectrophotometer (model UV-160A UV-Visible Recording, Shimadzu, Japan), at 812 nm wavelength and each sample was compared with the zero value. Phosphate concentrations in each sample were extrapolated from the standard curve.

## 2.4 ANALYSIS OF LIPIDS FROM SPERMATOOZOA BY MALDI-TOF MS.

All organic spermatozoa extracts were mixed (1:1, v/v) with the matrix solution and subsequently applied onto the MALDI gold target plate as 1µL droplets. Lipid extracts were premixed with 0.5mol/L DHB in methanol and 9-AA (10mg/mL) in isopropanol/acetonitril (60:40, v/v) (SCHILLER *et al.*, 2000). Subsequently, the samples were allowed to crystallize drying under moderate warm stream (SCHILLER *et al.*, 1999). Positive and negative ion MALDI-TOF MS were acquired on an Autoflex workstation (Bruker, Bremen, Germany). The system utilizes a pulsed nitrogen laser emitting at 337nm. The extraction voltage was 20kV and the low mass gate was turned on at m/z= 200. One hundred and twenty-eight single laser shots were averaged for each mass spectrum to minimize shot-to-shot deviations. The information about cholesterol was not obtained because cholesterol is not detectable

in mass spectra as such but only subsequent to water elimination. All spectra were processed using the software Flex Analysis version 2.2 (Bruker, Germany). The lipids ratios were calculated just for the animals with the same lipids in the same matrix and a variability index for each animal was calculated by dividing the total number of different lipids detected during the screening of its own sample by the total number of lipids screened for all evaluated samples.

## 2.5 STATISTICAL ANALYSIS

Means ( $\pm$  SEM) were calculated for each individual for cholesterol and phosphate content, cholesterol:phosphate ratio, ratio between lipids and index of variability from MALDI-TOF screening. Based on percentage of morphologically normal sperm (data not included), samples were divided into two groups: Normospermic (>60%) or Teratospermic (<60%), and subsequent Student *t* tests comparisons were performed. Differences between the breeding (breeding season is the most suitable season, usually with favorable conditions and abundant food and water, for breeding among some animals) e nonbreeding seasons were also tested by Student *t* comparisons. Pearson's correlations among variables were calculated for the samples collected only within the breeding season. Analysis was done with STATISTICA software (StatSoft Inc., Tulsa, OK) with a p-level of 5%.

## II. 3. RESULTS

### 3.1. CHOLESTEROL CONTENT

Only organic extracts of samples containing at least  $10 \times 10^6$  spermatozoa were used to measure the cholesterol content in sperm and 62 samples met that criterion. The values of sperm concentration ranged from  $10.2 \times 10^6$  to  $46.5 \times 10^6$  sperm cells and the mean cholesterol content ( $\pm$ SEM) was  $0.30 \pm 0.21$  nMol/ $10^6$  sperm cells.

When data were compared according to season (spring/summer *versus* fall/winter) it was possible to detect a tendency ( $p= 0.06$ ) for a higher cholesterol contents in spring/summer samples ( $0.34 \pm 0.04$  nMol/ $10^6$  sperm cells ) in relation to those collected in fall/winter ( $0.22 \pm 0.04$  nMol/ $10^6$  sperm cells). Furthermore, a significant positive correlation between cholesterol contents in sperm and testicular levels of  $17\beta$ -estradiol ( $r= 0.50$ ; data not included) was found. Normospermic and teratospermic samples did no differ in cholesterol content of the sperm membrane.

### 3.2. PHOSPHATE CONTENT AND CHOLESTEROL:PHOSPHATE RATIO

Samples analyzed for phosphate content contained a minimum of  $30 \times 10^6$  and a maximum of  $106.9 \times 10^6$  sperm cells, with a mean of phosphate content of  $1.03 \pm 0.64$  nMol/ $10^6$  sperm cells. No significant differences between seasons were found. However, significant positive correlations between phosphate content in sperm membrane and percentage of acrossomal abnormalities ( $r= 0.60$ ) and testicular levels of  $17\beta$ -estradiol ( $r= 0.65$ ) and testosterone ( $r= 0.52$ ) were found.

A mean molar cholesterol/phospholipid ratio of  $0.30 \pm 0.06$  could be calculated in 24 samples. This ratio showed a tendency to be higher in autumn/winter samples ( $p= 0.06$ ), with a mean of  $0.35 \pm 0.02$ , than in spring/summer samples which showed a mean of  $0.29 \pm 0.01$ . Normospermic samples shown a higher



cholesterol/phospholipid ratio ( $0.31 \pm 0.01$ ;  $n=17$ ) than teratospermic ones ( $0.26 \pm 0.02$ ;  $n=7$ ).

### 3.3. SCREENING OF LIPIDS FROM SPERMATOZOA OF DOMESTIC CATS

Seventy-one samples were analyzed with a total sperm number ranging from  $0.74$  to  $117.7 \times 10^6$  spermatozoa with a mean ( $\pm$ SEM) of  $25.33 \pm 2.4 \times 10^6$  spermatozoa. The analysis of positive ion MALDI-TOF mass spectra of the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa showed a high individual variability characterized either by a variability on the composition of distinct phospholipids species or a large variety of fatty acids residues on these lipids (Table 1). Positive mass spectrum was dominated by lysophosphatidylcholine (LPC), phosphatidylcholine (PLC) and sphingomyelin (SM).

A significant number of lysophospholipids traces (LPL) was identified and detected in mass spectra between  $m/z= 475$  and  $550$  from individual samples, which are shown in Figure 1. The mass spectra was characterized specially by saturated fatty acids such as palmitic acid (16:0) and stearic acids (18:0) and dominated by lysophosphatidilcholine (LPC) specially LPC 16:0 alkyl ( $m/z = 482.3$  - proton adduct), LPC 16:0 ( $m/z = 496.3$  – proton adduct) and LPC 18:0 ( $m/z = 524.3$  – proton adduct) which were detectable in 45, 52 and 56 individual samples, respectively. As contrast, LPC 16:0 ( $m/z = 518.3$  – Natrium adduct), LPC 18:0 ( $m/z = 546.3$  – Natrium adduct) and LPC 22:5 ( $m/z = 570.3$  –  $H^+$  adduct) were detected only in eight, nine and eleven samples, respectively. There were detectable LPC (18:1) and LPC (18:2) in 18 and nine samples at  $m/z 522.3$  (Proton adduct) and  $520.5$  (Proton adduct), respectively.

Species of diacylglycerol (Table 1), lipid produced by cleavage of inositol phospholipids ( $PIP_2$ ) in response to extracellular signals were detected in ion positive mass spectra in 39 ( $m/z= 569.5$  corresponding  $H^+$  adduct), 10 ( $m/z= 591.5$  corresponding  $Na^+$  adduct) and 15 ( $m/z= 647.6$  corresponding Natrium adduct) samples, respectively. These species were characterized only by unsaturated fatty acids as palmitic acid (16:0) and stearic acids (18:0). Two species of Ceramide (16:0) were detected at ion positive mass spectra with noise signal at ( $m/z$ ) 538.5 and 560.5, corresponding  $H^+$  and  $Na^+$  adducts, in 27 and eight samples, respectively. The

Ceramide (18:0) was detectable at  $m/z$  577.6 as sodium adduct in eleven samples.

Relatively high intensities of characteristic lipoperoxidation were detectable at ion positive mass spectra with noise signal at ( $m/z$ ) 650.5 (PC 16:0, 18:1, aldehyde), 666.5 (PC 16:0, 18:1, aldehyde oxidation), 678.5 (PC 18:0, 18:1, aldehyde), 694.5 (18:0, 18:1, aldehyde oxidation), 700.6 (PC 16:0, 22:5, aldehyde oxidation) in 30, 22, 38, 27 and 36 samples of domestic cats (Figure 2). Most of samples showing these oxidation products were collected in 2007 and 2008. Only low intense peaks of formyl-lysophosphatidylcholine (22:6) one product of phosphatidylcholine peroxidation resulting by cleavage of fatty acids residues in sn-2 position by phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) enzyme could be detected with signal noise ratio at  $m/z$ = 618.4 and  $m/z$ = 596.3 corresponding to sodium and proton adducts (FUCHS *et al.*, 2007) in 38 and 15 samples, respectively and the most of these samples were collected at 2007-2008.

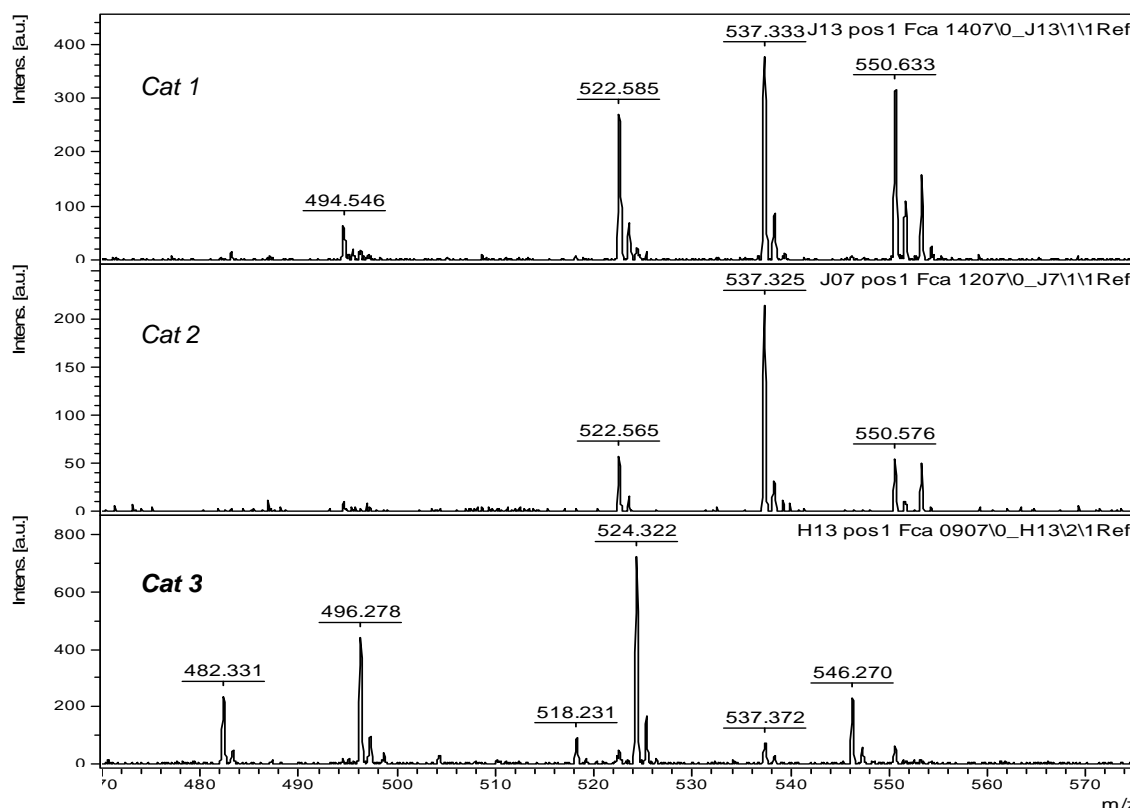


Figure 1. Positive ion MALDI-TOF mass spectra (matrix 9-Aminoacridin) in the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats.  $m/z$ = 482.3 H<sup>+</sup>- adduct of Lysophosphatidylcholine (LPC, 16:0 alkyl), 496.3/518.3: LPC (16:0), 522.6: LPC (18:1), 524.3/546.3: LPC (18:0).

Only plasmalogens like choline species were detected in our samples and they were detectable in the positive ion mass spectra (Figure 3). PC (18:0 alkenyl, 18:1 acyl) was detectable as proton adduct ( $n= 43$ ) and sodium adduct ( $n= 48$ ), PC (16:0 alkenyl, 22:6 acyl) was identified as  $H^+$  adduct and  $Na^+$  adduct only in 37 and 26 samples, respectively. The plasmalogens were detected only as very low peaks, showing fatty acid residues of saturated and unsaturated acids. Data are shown in Figure 3.

The positive ion spectrum of phospholipids from epididymal spermatozoa from domestic cats was dominated by species of phospholipids like choline (Figure 4). The spectrum was characterized specially by saturated fatty acids (palmitic acid - 16:0 and stearic acid – 18:0) and minor contents of oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2), docosapentanoeyl acid (22:5), docosahexanoeyl acid (22:6) and arachidonic acid (22:4) and a relatively high variety of PC species was identified in the samples (Table 1). The highest peaks in the samples were  $m/z= 786.6, 794.6, 808.6, 836.6$  and  $858.6$  (Figure 4) containing palmitic acid and/or docosapentaenoyl acid (DPA) and the peaks  $m/z= 786.6, 788.6, 760.6, 806.6, 808.6, 836.6$  and  $794.6$ , which were detectable in more than 70% of the samples. The peaks with signal noise ratio at  $m/z= 728.5, 734.6, 758.5, 790.6, 810.6, 816.6, 830.6$  and  $858.6$  were detected in 31 to 49 samples and the another PC species as well as  $m/z= 706.5, 728.5, 756.6, 758.6, 759.6, 760.6, 766.6, 780.5, 782.6, 790.6, 792.5, 806.6, 812.6, 818.6, 832.6$  and  $834.6$  were detected in lower number of samples, between thirty or less (see Table 1 for more details).

Apart from PC and Lyso-PC species, the ion positive spectrum was also dominated by sphingomyelin (Table 1). The SM (16:0) was identified at signal noise ratio of 703.5 corresponding proton adduct and 725.5 corresponding sodium adduct (Figure 4). These peaks were detected in 48 and 57 samples, respectively, but just as small contents. The seminolipid (1-O-palmityl-2-O-palmitoyl-3- $\beta$ -(3'-sulfogalactosyl)-glycerol) could be detected in 57 samples with relatively small contents in ion positive spectra at  $m/z= 841.6$ . Also this seminolipid was the only detectable compound in the ion negative spectra at  $m/z= 795.6$ . It was detected in all samples with relatively high peaks and high contents. Although in very low peaks, triacylglycerol species were (TAG) detectable in a high number of samples ( $n= 51$ ) especially triolein (TAG 3'18:2) at  $m/z= 901.8$  corresponding to  $Na^+$  adduct. However

the TAG 16:0/2'18:1 was detected at  $m/z= 881.8$  corresponding to sodium adduct in only 13 samples.

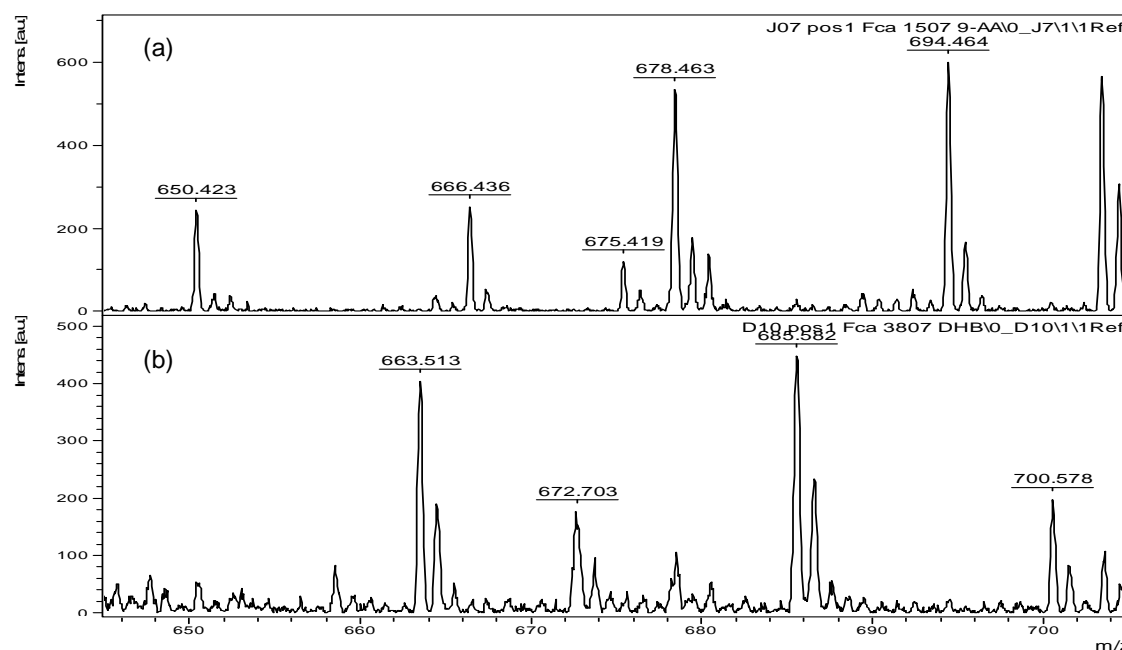


Figure 2. Positive ion MALDI-TOF mass spectra in the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats. (a) Corresponding to detectable spectra in the matrix 9-Aminoacridin in which peaks at  $m/z= 650.5$ ,  $666.5$ ,  $678.5$  and  $694.5$  were detected. (b) Corresponding to detectable spectra in the matrix DHB in which only the peak at  $m/z= 700.6$  was detected. These peaks correspond to oxidation products in the sperm membrane at the samples. More details in Table 1.

Ratios between the peaks heights for some lipids were calculated in the same matrix. For example, PC alkenyl/acyl (18:0, 18:1)/(16:0, 22:6) ratio in DHB matrix was possible to be calculated in 27 samples and had an average of  $0.88 \pm 0.07$ . This ratio showed a significant and positive correlation with percentage of tightly coiled flagellum ( $r= 0.61$ ). The PC (18:0, 22:6)/(18:0, 22:5) in 9A-Acridin matrix ratio was calculated in 15 samples and had an average of  $0.35 \pm 0.10$ . This ratio showed a significant and positive correlation with normal sperm morphology ( $r= 0.9$ ) and negative correlation with primary sperm abnormalities ( $r= -0.93$ ) and secondary sperm abnormalities ( $r= -0.78$ ), sperm motility ( $r= -0.86$ ) and sperm motility index ( $r= -0.77$ ).

As for index of variability, it ranged from 0.13 to 0.92 for all samples. When normospermic ( $n=20$ ) and teratospermic groups ( $n=10$ ) were compared, we found a significant difference in the index of individual variability. It was higher for normospermics ( $0.66 \pm 0.03$ ) than in the teratospermic group ( $0.54 \pm 0.03$ ). The index of individual variability showed significant and negative correlation with sperm morphology: percentage of primary ( $r=-0.39$ ) and secondary sperm ( $r=-0.52$ ) defects and percentage of bent flagellum with droplet ( $r=-0.61$ ). We also found a significant and positive correlation with percentage of normal sperm ( $r=0.60$ ) and intratesticular testosterone:17 $\beta$ -estradiol ratio ( $r=0.51$ ).

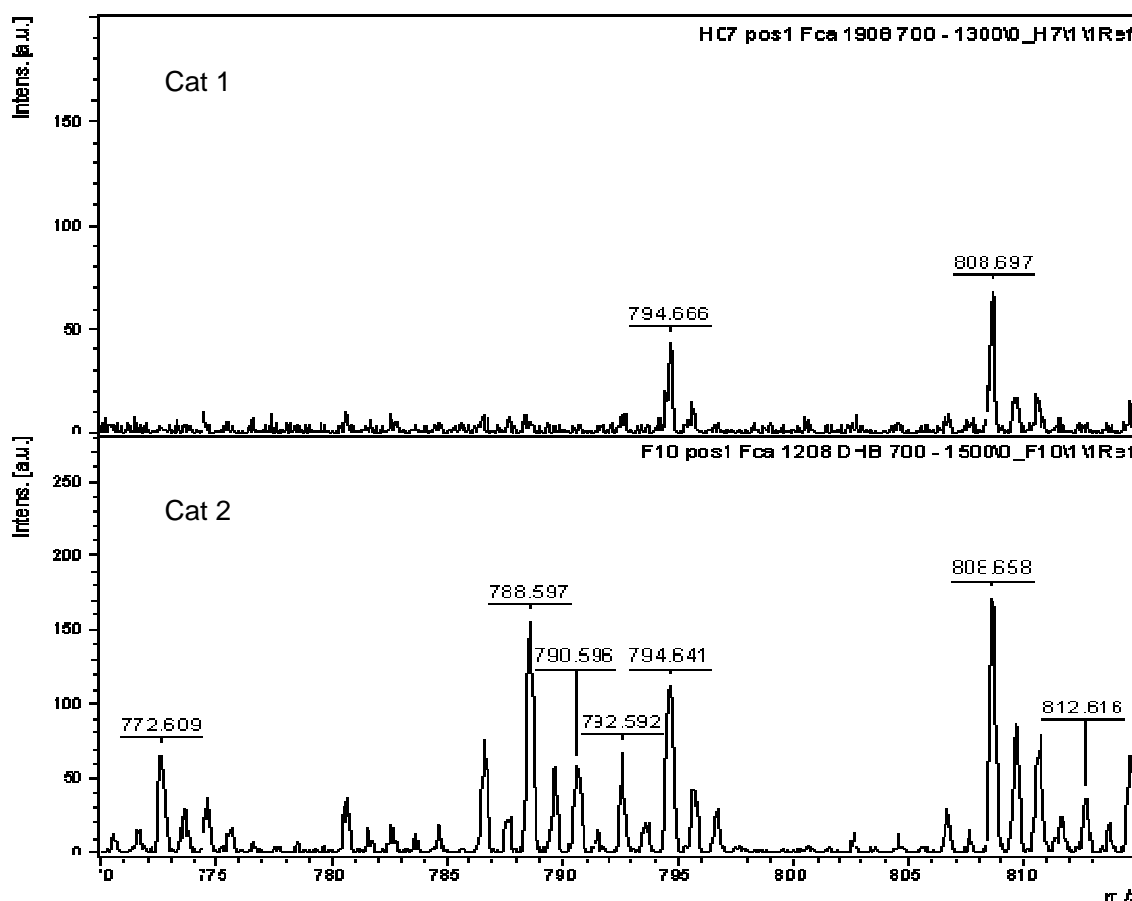


Figure 3. Positive ion MALDI-TOF mass spectra (DHB matrix) in the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats.  $m/z=772.6/794.6$  H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> adducts of PC (18:0 alkenyl, 18:1 acyl),  $m/z=790.6/812.6$  H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> adducts of PC (16:0 alkenyl, 22:6 acyl). These peaks correspond to plasmalogens species detectable in the samples.

Table 1. Assignment of the  $m/z$  ratios detected in the positive ion MALDI-TOF mass spectra of the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats.

$m/z$ Ratio	Assignment
569.5	Diacylglycerol 2'16:0 + $H^+$
591.5	Diacylglycerol 2'16:0 + $Na^+$
647.6	Diacylglycerol 2'18:0 + $Na^+$
703.6	SM 16:0 + $H^+$
706.5	PC 14:0/16:0 + $H^+$
725.6	SM 16:0 + $Na^+$
728.5	PC 14:0/16:0 + $Na^+$
734.6	PC 2'16:0 + $H^+$
756.6	PC 2'16:0 + $Na^+$
758.5	PC 16:0/18:2 + $H^+$
759.6	PC 16:0/18:0 + $H^+$
760.6	PC 16:0/18:1 + $H^+$
766.6	PC 16:0 alkyl, 18:2 acyl + $H^+$
772.6	PC 18:0 alkenyl, 18:1 acyl + $H^+$
780.5	PC 16:0/18:2 + $Na^+$
782.6	PC 16:0/18:1 + $Na^+$
786.6	PC 18:0/18:2 + $H^+$
788.6	PC 18:0/18:1 + $H^+$
790.6	PC 16:0 alkenyl, 22:6 acyl + $H^+$
790.6	PC 2'18:0 + $H^+$
792.5	PC 16:0 alkyl, 22:6 acyl + $H^+$
794.6	PC 18:0 alkenyl, 18:1 acyl + $Na^+$
794.6	PC 16:0 alkyl, 22:5 acyl + $H^+$
808.6	PC 18:0/18:2 + $Na^+$
808.6	PC 16:0/22:5 + $H^+$
810.6	PC 18:0/18:1 + $Na^+$
810.6	PC 18:0/20:4 + $H^+$
812.6	PC 16:0 alkenyl, 22:6 acyl + $Na^+$
812.6	PC 2'18:0 + $Na^+$
816.6	PC 16:0 alkyl, 22:5 acyl + $Na^+$
818.6	PC 16:0 alkyl, 22:4 acyl + $Na^+$
830.6	PC 16:0/22:5 + $Na^+$
832.6	PC 18:0/20:4 + $Na^+$
836.6	PC 18:0/22:5 + $H^+$
834.6	PC 18:0, 22:6 + $H^+$
841.6	Seminolipd (1-O-palmityl-2-O-palmitoyl-3- $\beta$ -(3'-sulfogalactosyl)-glycerol) + $2H^+$
858.6	PC 18:0/22:5 + $Na^+$

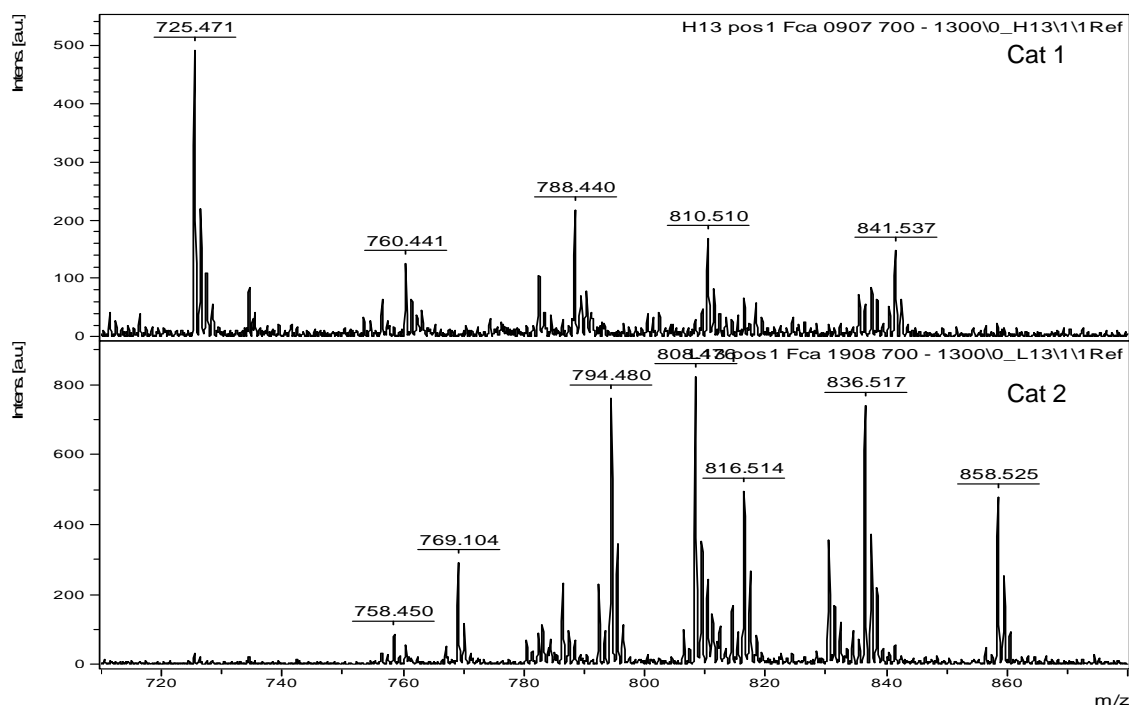


Figure 4. Positive ion MALDI-TOF mass spectra (9-Aminoacridin matrix) in the organic extracts of cauda epididymal spermatozoa from domestic cats.  $m/z=$  725.6:  $\text{Na}^+$  adduct of sphingomyelin (16:0), 758.5/780.5:  $\text{H}^+$ - and  $\text{Na}^+$  adducts of phosphatidylcholine (PC, 16:0, 18:2), 760.6/782.6: PC (16:0, 18:1), 786.6/808.6: PC (18:0, 18:2), 788.6/810.6: PC (18:0, 18:1), 794.6/816.6: PC (16:0 alkyl, 22:5 acyl), 808.5/830.5: PC (16:0, 22:5), 810.6/832.6: PC (18:0, 20:4), 836.6/858.6: PC (18:0, 22:5), 841.6: seminolipid.

## II. 4. DISCUSSION

The knowledge of the lipid composition of the sperm membrane is seen as an important tool for understanding the events that allow the spermatozoa to transform into vigorously active cells, with fecundation capacity (JONES, 1998), as well as for the development of the most suitable assisted reproduction techniques (FUCHS *et al.*, 2009) for those species that are endangered, such as some feline species. Nevertheless, as far as we know, this is the first study done with domestic cats in which the cholesterol and phosphate contents and the ratio between cholesterol and phosphate could be determined. In addition, we conducted a more detailed characterization of the lipid composition, through MALDI-TOF for this species, for which there is very scarce or no information at all in literature (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999; AXNÉR, 2006; FUCHS *et al.*, 2009). We also were able to detect important correlations between sperm lipid composition and sperm morphology and testicular hormone levels.

The results of this study pointed at the fact that domestic cats present lower amounts of cholesterol in the sperm than other species, such as human (MACK *et al.*, 1986), rabbits (CASTELLINI *et al.*, 2006), stallion (PARKS; LYNCH, 1992), bull (PARKS *et al.*, 1987) and ram (PARKS; HAMMERSTEAD, 1985; PARKS *et al.*, 1987). However, they present larger amounts of cholesterol than boar (PARKS; LYNCH, 1992), hamsters (AWANO *et al.*, 1989), silver (*Vulpes vulpes*) and blue foxes (*Alopex lagopus*) (MILLER JR. *et al.*, 2005). If we consider the hypothesis developed by White *et al.* (1993), who have associated cold-shock resistance and easier cryopreservation with higher levels of sterol (cholesterol and desmosterol) in the sperm membrane, the low levels of sterol found in the sperm from domestic cats could be one of the causes of the great inconsistency in the survival rates of feline spermatozoa after cryopreservation (ZAMBELLI *et al.*, 2000; TANAKA *et al.*, 2000; TSUTSUI *et al.*, 2000, 2003; PUKAZHENTHI *et al.*, 2002; PENFOLD *et al.*, 2003; TEBET *et al.*, 2006). We can also place the boar in this context, as they present even lower levels of cholesterol than cats and, until the moment, the semen of these animals could not be successfully cryopreserved. The silver fox, nevertheless, presents much lower levels of cholesterol in the sperm membrane than cats, as well as some species of marsupials, and the semen from these animals has been



successfully cryopreserved. This shows that, not only the high levels of sterols, but also the saturation degree of fatty acids (LENZI *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 1993), the proportion between cholesterol and phospholipids (DARIN-BENNETT *et al.*, 1973) and the content of plasmalogens can influence the resistance of the membrane to the freezing-thawing processes, as suggested by the authors above. According to Mann and Lutwak-Mann (1981) *apud* Schiller *et al.* (2000), plasmalogens seem to have a crucial role in the extent of the damage to the sperm membrane associated with cryopreservation.

Seasonal fluctuation is one factor known to have some influence on the lipid sperm membrane (Thorp, 1963 *apud* EVANS; SETCHELL, 1979a), as we have observed in our samples when comparing samples collected in autumn/winter with those from spring/summer. Reproduction in domestic cats is moderately influenced by seasonality (BLOTTNER; JEWGENOW, 2007) and reproductive parameters such as testicular weight, sperm production per testis, sperm motility and higher proportion of intact sperm are higher during spring and summer than during autumn and winter. The intratesticular testosterone levels are also higher during the reproductive season (BLOTTNER; JEWGENOW, 2007) and it is known that the steroids hormones are able to influence the metabolism of lipids (WALSH *et al.*, 1991; SAAD; GOOREN, 2009). Considering the positive correlation found between intratesticular estrogen and testosterone and cholesterol and phosphate contents in the spermatozoa in our study, it is possible to speculate that these hormones play a role in regulating the testicular metabolism of lipids and maybe the lipids requirements in spermatozoa is higher in spring and summer. However, this hypothesis remains to be tested.

The phospholipid content reported here for cauda epididymal spermatozoa from domestic cats was lower than that found in ram (EVANS; SETCHELL, 1979a), but higher when compared to that of rats (AVELDANO *et al.*, 1992) and boar (EVANS; SETCHELL, 1979b). The phospholipid content decreases as spermatozoa mature in the epididymis. These reduction is variable and highly selective among mammals species (AVELDANO *et al.*, 1992; RANA *et al.*, 1991; SCOTT *et al.*, 1967), playing an important role in sperm maturation and, consequently, in the subsequent events. The ratio between cholesterol and phospholipid contents obtained in this study is in accordance to literature (JONES, 1998; MARTINEZ; MORROS, 1996). However, this proportion is lower than that found in human (MACK *et al.*, 1986; GRIZARD *et al.*, 2000), stallion (PARKS;

LYNCH, 1992), bull (PARKS *et al.*, 1987; PARKS; LYNCH, 1992) and ram (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985) and higher than that proportion in boar (PARKS; LYNCH, 1992), hamsters (AWANO *et al.* 1989) and some species of marsupials (MILLER *et al.*, 2004). This result, together with the levels of sterols found in this study, could partially explain the challenges of cryopreservation of feline semen. Darin-Bennet *et al.* (1973) suggested that spermatozoa from species with higher cholesterol and phospholipids are less susceptible to cold shock than the spermatozoa from those species with lower proportions, as we have found and as is the case with swine. We were also able to find significant differences in the cholesterol/phospholipids ratio between teratospermic and normospermic samples. The lower ratio in the teratospermic samples could be suggested as playing a role on the higher susceptibility of teratospermic samples to cryopreservation damage when compared to normospermic ones (PUKAZHENTHI *et al.*, 1999). The proportion between cholesterol and phospholipids can influence the resistance of the membrane to the freezing-thawing processes (DARIN-BENNETT *et al.*, 1973) and the sperm of animals with higher ratio can be easily cryopreserved.

As for the qualitative determination of the lipid composition of the spermatozoa from felid species, MALDI-TOF mass spectrometry technique has been only recently used for this purpose (FUCHS *et al.*, 2009). One major difficulty to apply it is to obtain a sufficient total number of sperm cells from those animals and in suitable conditions to perform the procedure. In our study, results were characterized by a high variability in the lipid profile, which might be at least in part explained by the great variability in the number of spermatozoa available for analysis, ranging from  $0.74 \times 10^6$  to  $117.7 \times 10^6$  spermatozoa and by differences in animals diet (EVANS; STECHELL, 1979b; GLIOZZI *et al.*, 2009; ROOKE *et al.*, 2001; THUWANUT *et al.*, 2008), as the collection method was standardized for all of them. Another characteristic of our data is the prevalence of lysophospholipid choline (LPC), phospholipid choline (PLC) and sphingomyelin (SM) in the positive-ion mass spectrum, which is in accordance to previous data for human, bull and boar (FUCHS *et al.*, 2009; LESSIG *et al.*, 2004; SCHILLER *et al.*, 2003). According to Petković *et al.* (2001), these types of lipid contain groups of quaternary ammonium in their constitution, resulting in the suppression of other classes of phospholipids, which are not, thus, detectable in the positive-ion MALDI-TOF spectrum. Besides, due to the high acidity of the sulphate group of this seminolipid, minor signs of negatively-

charged phospholipids (PLP), such as PLS and PLI, are completely suppressed in the presence of the seminolipid.

Types of LPC, especially LPC 18:0 ( $m/z$ = 524.3 and 546.3,  $H^+$  and  $Na^+$  adducts), corresponding to digestion products with  $PLA_2$ , have been recently characterized through the MALDI-TOF technique by Petković *et al.* (2005) and, as far as we know this is the first description of the detection of LPC profiles in extracts of spermatozoa from domestic cats. These results differ from those found by Fuchs *et al.* (2009), in which no types of LPC could be detected in domestic cats, Syberian tiger and Fosa. Maybe the higher number of samples with higher sperm concentration in our study had allowed the detection of those types of LPC or because our samples were stored for longer periods than those of Fuchs *et al.* (2009). Acrosome membrane disturbances result in the liberation of  $PLA_2$  and, consequently, in the formation of LPC (16:0,  $m/z$ = 496.3 and 518.3; LESSIG *et al.*, 2006). The LPC detection in our samples maybe considered a relevant finding since this LPCs are intra and extracellular signaling molecules as well as important fusogenic components of the sperm membrane, fundamental for successful fecundation (ASAOKA *et al.*, 1991; GÓMES-MUNHOZ *et al.*, 1999; MARTINEZ; MORROS, 1996; OZAKI *et al.*, 1999). The detection of these elements in some samples might be the result of a premature sperm reaction in spermatozoa, a consequence of membrane disturbance and unbalance during the unprotected freezing process of the samples (LUVONI *et al.*, 2003).

Diacylglycerol is a kind of lipid resulting from the cleavage of phosphatidylinositol ( $PIP_2$ ), which has an important function as second messenger within cells (DE ROBERTS *et al.*, 2003). The detection of this lipid has been accurately done by Benard *et al.* (1999) through MALDI-TOF, as it also occurred in the extracts from our domestic cats samples. This diacylglycerol detection shows that the phospholipids like inositol are present in the sperm, even that these species of lipid were not detected in the negative-ion spectrum, the only spectrum in which they are detectable following this methodology (PETKOVIĆ *et al.*, 2001; FUCHS; SCHILLER, 2009). Diacylglycerol is implicated in the regulation of cellular functions including proliferation, differentiation and other specifics functions (HODGKIN *et al.*, 1998).

The generation of aldehydes and products resulting from PC peroxidation containing polyunsaturated fatty acid residues, which were detected in our samples,

confirms the occurrence of this process during domestic cat spermatozoa freezing, as suggested by Thuwanut *et al.* (2009). The detection of formyl-LPC 22:6, resulting from the action of PLA<sub>2</sub> over plasmalogen choline (GPC 16:0<sub>plasm</sub>/22:6), confirms the presence of plasmalogens in the extracts, and, at the same time, points to the occurrence of lipid peroxidation in the samples, as detected in roe deer by Fuchs *et al.* (2007). Contrary to what has been observed in bovine, swine and roe deer, in which the spectrum obtained from sperm membrane extracts is dominated by the presence of ether-linked plasmalogens (LENZI *et al.*, 1996; SCHILLER *et al.*, 2003; FUCHS *et al.*, 2009), only very small quantities of this lipid species could be detected in our samples, as well as previously reported for domestic cats (FUCHS *et al.*, 2009). We suggest that this could be consequence of the reduced amount of spermatozoa in domestic cat samples when compared to other species. Other possibility would be the presence of acid substances in contact with the sample, which would, according to Wright *et al.* (1997), result in destruction of the plasmalogens, as those are extremely sensitive to acid action. However, extreme care was taken to avoid destruction of the plasmalogens even in the matrix used in the methodology. Therefore it is possible that a higher quantity of sperm allow the detection of more plasmalogen in the sperm membrane of domestic cats.

From our results, the lipid composition of the spermatozoa from domestic cats is characterized by the presence, almost exclusively, of species of phosphatidylcholine (PC), which was similar to the mass spectrum MALDI-TOF observed in domestic cats, Syberian tiger and Fosa (FUCHS *et al.*, 2009) and human (SCHILLER *et al.*, 2000). According to these previous studies, sperm of domestic cats also present saturated fatty acid residues. We were able to detected most of them, such as palmitic acid (16:0), stearic acid (18:0) and DPA (22:5) and, to a lesser extent, oleic acid (18:1), linoleic acid (18:2) and DHA (22:6), which is in accordance to the residues found predominantly in human and other animals (Christic W.W., 2003 *apud* FUCHS; SCHILLER, 2009). However, in opposition to what was observed in human, bull, ram and monkeys, which show rather high levels of DHA (LIN *et al.*, 1993; NISSEN; KREYSEL, 1983; POULOS *et al.*, 1973), small quantities of DHA could be detected in the spectrum of feline. Larger amounts of the DHA residue have been associated in human with better motility and sperm morphology (GULAYA *et al.*, 2001; LENZI *et al.*, 2000) and in boar with an increase in sperm motility and reduction of spermatozoa abnormally formed (ROOKE *et al.*, 2001).

The SM detection (16:0,  $m/z$ = 703.6 e 725.6) observed in this study is in accordance to that observed in extracts from the sperm in swine samples, human (LESSIG *et al.*, 2004) and feline (FUCHS *et al.*, 2009). Besides, boar spermatozoa have much larger amounts of SM (14:0), which was not detected in the spectrum of domestic cats. In a study conducted in bulls and rats by Furland *et al.* (2007), it was found that this lipid originates in the testis and SM in spermatozoa is highly concentrated in the head and is probably important in sperm fusion processes. In addition, the seminolipid (1-O-palmitil-2-O-palmitoil-3- $\beta$ (3'-sulfogalactosil)-glycerol detected in the extracts from this study produced exactly the same peaks in the positive spectrum ( $m/z$ = 841.6,  $\text{Na}^+$  adduct) and in the negative one ( $m/z$ = 795.5), which is in accordance with previous findings for swine, human (LESSIG *et al.*, 2004) and feline (FUCHS *et al.*, 2009). However, in feline the seminolipid cannot be detected in the positive-ion spectrum, probably due to sample number and sperm concentration. Seminolipids are essential for the function of germ cells in spermatogenesis (FUJIMOTO *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2005), having been detected in plasma membrane of spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa in rats (ZHANG *et al.*, 2005).

The correlations we found between the ratio of some lipids and sperm characteristics points out to interesting findings. For example, PC alkenyl/acyl (18:0, 18:1)/(16:0, 22:6) and sperm abnormalities is in accordance with Aksoy *et al.* (2006), which found a positive correlation between DHA and normal sperm morphology. The DHA is required for maintaining the fluidity of the spermatozoa membrane and their fertilizing ability (CONNOR *et al.*, 1998). The negative correlation found in this study between the ratio of PC (18:0, 22:6)/(18:0, 22:5) and the percentage of spermatozoa defects is in accordance with Gulaya *et al.*, (2001), Lenzi *et al.* (2000) and Tavailani *et al.* (2007), which were able to find positive correlation between DHA and percentage of normal sperm. It is known that the phospholipids bound DHA plays a major role in the sperm membrane fluidity, which may arise the hypothesis that higher success rate in cryopreservation of bull (POULAS *et al.*, 1973; POULOS *et al.*, 1973) and African elephant spermatozoa (SWAIN *et al.*, 2000) are in part consequence of the presence of high levels of DHA in its membranes, when compared to Asian elephants (SWAIN *et al.*, 2000) and boar spermatozoa (POULAS *et al.*, 1973; POULOS *et al.*, 1973). Furthermore, different amounts of DHA were found in sperm membrane of marsupials, with Koala and the common wombat presenting higher

levels of DHA than the Western grey kangaroo and higher levels of DHA had been associated with successful sperm cryopreservation (MILLER JR. *et al.*, 2004). Thus, although quantifying DPA and DHA in the sperm membrane from domestic cats was not possible in this study, based on peaks heights, we can speculate that these animals have larger amounts of DPA, which, associated with smaller levels of cholesterol in the membrane, may be involved in the very inconsistent and variable results of feline semen cryopreservation among the research laboratories (ZAMBELLI *et al.*, 2000; TANAKA *et al.*, 2000; TSUTSUI *et al.*, 2000, 2003; PUKAZHENTHI *et al.*, 2002ab; PENFOLD *et al.*, 2003). Such results are particularly important for *in vitro* fertilization studies, as high amounts of fatty acids are needed for the high fluidity of the sperm membrane, required for successful fertilization (LESSIG *et al.*, 2004; ZALATA *et al.*, 1998). Only the quantitative determination of these fatty acid levels could actually clarify this matter. Nonetheless, this is still hindered by the difficulty in obtaining the total sperm concentration in sufficient and suitable quantities for quantitative determinations.

Finally, the significant and negative correlations between index of lipid variability on individual screenings with percentage of sperm with primary and secondary defects and with percentage of bent flagellum with droplet, specially this later one, suggest a crucial rule for sperm membrane lipid composition on resistance of spermatozoa to changes in osmolality of testicular and epididymal environment. As teratospermic samples had a lower index of variability and presents the higher levels of bent flagellum, we could suggest that normal sperm morphology is dependent of a higher variability of lipids species, which in turn, apart from nutrition, it is under endocrine regulation since animals presenting a higher intratesticular testosterone:estradiol ratio had also higher index of lipid variability.

In conclusion, we suggest that the lipid composition of the epididymal spermatozoa from domestic cats and, possibly, that of ejaculated spermatozoa, is strongly related to the sperm quality and to its freezability. Feline sperm lipid composition makes more difficult to sperm to resist to the stress of cryopreservation in comparison to bovine or human sperm, although it would have better freezability index than swine. The variability on lipid composition would also explain species and individual differences on the outcomes of spermatozoa cryopreservation in feline in several research laboratories. However, as our results are mostly qualitative, it would be necessary a quantitative determination of the sperm membrane lipids from

domestic cats to actually bring more clarity on this subject. That would favor the planning and execution of strategies to improve the spermatozoa cryopreservation results in feline, such as dietary changes and the development of more suitable cryopreservation protocols, based on dietary supplementation with omega-3 and omega-6 fatty acids and the addition of substances with antioxidant action and lipids such as DHA to the semen freezing protocols, as has already been done for domestic cats (THUWANT *et al.*, 2008), boar (ROOKE *et al.*, 2001) and rabbits (GLIOZZI *et al.*, 2009).

## II. 5. REFERENCES

- AKSOY, Y., AKSOY, H., ALTINKAYNAK, K. et al. Sperm fatty acid composition in subfertile men. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty Acids**, v.75, p. 75-79, 2006.
- APEL-PAZ M. A hierarchy of lipid constructs for sperm plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 724-732, 2003.
- AVELDANO M. I. et al. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 283, p. 235-241, 1992.
- AWANO M. et al. Identification of cholesta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol and desmosterol in Hamster Cauda Epididymal spermatozoa. **Lipids**, v. 24, n. 7, p. 662-664, 1989.
- AXNÉR E. Sperm maturation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, p. 14-24, 2006.
- AXNÉR, E., PUKAZHENTHI, B.S., WILDT, D.E. et al. Creatine phosphokinase in domestic cat epididymal spermatozoa. **Molecular reproduction and development**, v. 62, p. 265-270, 2002.
- ASAOKA Y. et al. Lysophosphatidylcholine as possible second messenger synergistic to diacylglycerol and calcium ion for T-lymphocyte activation. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, v. 178, p. 1378-1385, 1991.
- BENARD S. et al. Experiments towards quantification of saturated and polyunsaturated diacylglycerols by matrix-assisted laser desorption and ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Chemistry and physics of lipids**, v. 100, p. 115-125, 1999.
- BLIGH E. G.; DYER W. J. A rapid method for total lipids extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BLOTTNER, S., JEWGENOW, K. Moderate Seasonality in testis function of domestic cat. **Reproduction of domestic animal**, v. 42, p. 536-540, 2007.
- BÖTTCHER C. J. F., VAN GENT C. M., PRIES C. A rapid and sensitive submicro phosphorus determination. **Analytical Chemical Acta**, v. 24, p. 203-204, 1961.
- CASTELLINI C. et al. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. **Theriogenology**, v. 65, p. 703-712, 2006.
- CEROLINI S. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, p. 395-401, 2001.



CONNOR, W.E., LIN, D.S., WOLF, D.P. *et al.* Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. **Journal of Lipid research**, v. 39, p. 1404-1411, 1998.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of reproduction**, v. 59, p. 07-11, 1998.

DARIN-BENNETT A., POULOS, A., WHITE I. G. The effects of cold freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. **Australian Journal Biological Science**, v. 26, p. 1409-1420, 1973.

DAVIS, B.K. Interaction of Lipids with the Plasma Membrane of Sperm Cells. I. The Antifertilization Action of Cholesterol. **Archives of Andrology**, v. 5, n.3, p. 249-254, 1980.

DE ROBERTS E., HIB J., PONZIO R. **De Robertis Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 410p.

EVANS R. W.; SETCHELL B. P. Lipid changes during epididymal maturation in ram spermatozoa collected at different times of the year. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 197-203, 1979a.

EVANS R. W.; SETCHELL B. P. Lipid changes in boar spermatozoa during epididymal maturation with some observations on the flow and composition of boar rete testis fluid. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 189-196, 1979b.

FUCHS B. *et al.* Characteristics oxidation products of choline plasmalogens are detectable in cattle and roe deer spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry. **Lipids**, v. 42, p. 991-998, 2007.

FUCHS B.; SCHILLER J. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in lipidomics. **European journal of lipid science and technology**, v. 111, p. 83-98, 2009.

FUCHS B. *et al.* MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. **Theriogenology**, v. 71, p. 568-575, 2009.

FUJIMOTO H. *et al.* Requirement of seminolipid in spermatogenesis revealed by UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase-deficient mice. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 275, n. 22, p. 623-626, 2000.

FURLAND N. E. *et al.* Very long-chain polyunsaturated fatty acids are the major acyl groups of sphingomyelin and ceramides in the head of mammalian spermatozoa. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 25, p. 18151- 18161, 2007.

GLIOZZI T. M. *et al.* Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. **Theriogenology**, v. 71, p. 910-919, 2009.

GÓMES-MUNHOZ A. *et al.* Lysophosphatidylcholine stimulates phospholipase D activity in mouse peritoneal macrophages. **Journal of lipid research**, v. 40, p. 988-993, 1999

GRIZARD, G. *et al.* Separation and quantification of cholesterol and major phospholipids classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. **Journal of Chromatography B**, v. 740, p. 101-109, 2000.

GULAYA N. M. *et al.* Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Achieves of Andrology**, v. 4, p. 169-175, 2001.

HODGKIN, M. N. *et al.* Diacylglycerol and phosphatides: which molecular species are intracellular messengers? **Trends Biochemical Science**, v. 23, p. 200-204, 1998.

HOWARD, J.G., BROWN, J.L., BUSH, M. *et al.* Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones in improvement of spermatozoal viability and morphology after swim processing. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 204-215, 1990.

JONES R. Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. **Journal of reproduction and fertility supplement**, v. 53, p. 73-84, 1998.

LANGLAIS J.; ROBERTS K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Research**, v. 12, p. 183-224, 1985.

LENZI A. *et al.* Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, n.3, p. 246-256, 1996.

LENZI A. *et al.* Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 3, p. 226-231, 2000.

LESSIG J. *et al.* Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 137, p. 265-277, 2004.

LESSIG J. *et al.* Destabilization of the acrosome results in release of phospholipase A2 from human spermatozoa and subsequent formation of lysophospholipids. **Journal of Andrology**, v. 38, p. 69-75, 2006.

LIN D. S. *et al.* Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. **Journal of Lipid research**, v. 34, p. 491-499, 1993.

LUVONI, G.C., KALCHSCHMIDT, E., MARINONI, G. Conservation of feline semen Part II: Cold-induced damages on spermatozoal fertilizing ability. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.5, p. 257-263, 2003.

MACK S. R.; EVERINGHAM J.; ZANEVELD L. J. D. Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 240, p. 127-136, 1986.

MARTINEZ, P. E MORROS, A. Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p.103-117, 1996.

MILLER JR. R. R. *et al.* Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. **Cryobiology**, v. 49, n. 00, p. 137-148, 2004.

MILLER JR. R. R. *et al.* Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. **Cryobiology**, v. 51, p. 66-75, 2005.

NISSEN H. P.; KREYSEL H. W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 15, p. 264-269, 1983.

OZAKI H. *et al.* Lysophosphatidylcholine activates mitogen-activating protein kinases by a tyrosine kinase-dependent pathway in bovine aortic endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 143, p. 261-266, 1999.

PARKS J. E.; LYNCH D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255-266, 1992.

PARKS J. E.; HAMMERSTEAD R. H. Developmental Changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 653-668, 1985.

PARKS J. E.; ARION J. W.; FOOTE R. H. Lipids of plasma-membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 37, n.00, p. 1249-1258, 1987.

PENFOLD L. M. *et al.* Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1730-1735, 2003.

PETKOVIĆ M. *et al.* Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. **Analytical Biochemistry**, v. 289, p. 202-216, 2001.

PETKOVIĆ M. *et al.* Application of matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry for characterization of the substrate specificity of neutrophil phospholipase A<sub>2</sub>. **Microchemical Journal**, v. 80, p. 31-37, 2005.

POULAS J. K. *et al.* Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. **Biochemical and Biophysics Acta**, v. 306, p. 194-202, 1973.

POULOS A.; DARIN-BENNETT A.; WHITE A. G. The phospholipid bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 46, p. 375-385, 1973.

PUKAZHENTHI, B., PELICAN, K., WILDT, D.E. *et al.* Sensivity of domestic cat (*Felis catus*) sperm from normospermic versus teratospermic donors to cold-induced acrosomal damage. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 135-141, 1999.

PUKAZHENTHI, B.S., WILDT, D.E., HOWARD, J.G. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 57, p.423-433, 2001.

PUKAZHENTHI, B., SPINDLER, R., WILDT, D. *et al.* Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 44, p. 288-300, 2002.

PURDY, P.H., GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, p. 36-45, 2004.

WHITE I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 639-658, 1993.

RANA A. P. S. *et al.* Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1061, p. 185-196, 1991.

ROOKE J. A.; SHAO C. C.; SPEAKE B. K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, v. 121, p. 315-322, 2001.

SAAD, F., GOOREN, L. The role of testosterone in the metabolic syndrome: a review. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 114, n. 1-2, p. 40-43, 2009.

SCHILLER J. *et al.* Lipid analysis by matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry: a methodological approach. **Analytical Biochemistry**, v. 267, p. 46-56, 1999.

SCHILLER J. *et al.* Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy – effects of freezing and thawing. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 106, p. 145-156, 2000.

SCHILLER J. *et al.* Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry – a cautionary note. **Chemistry and Physics Lipids**, v. 126, p. 85-94, 2003.

SCOTT T. W., VOGLMAYR J. K.; SETCHELL B. P. Lipid Composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Biochemical Journal**, v. 102, p. 456-461, 1967.

SION B., GRIZARD D., BOUCHER D. *et al.* Quantitative analysis of desmosterol, cholesterol and cholesterol sulfate in semen by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 935, p. 259-265, 2001.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ª ed. Manole: São Paulo, 1999. v2.

SPINDLER R. E.; WILDT D. E. Circannual variations in intraovarian oocyte but not epididymal sperm quality in the domestic cat. **Biology of reproduction**, v. 61, p. 188-194, 1999.

SWAIN J. E.; MILLER JR R. R. A post-cryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. **Zoo Biology**, v. 19, p. 461-473, 2000.

TANAKA, A., TAKAGI, Y., NAKAGAWA, K., FUJIMOTO, Y., HORI, T., TSUTSUI, T. Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v. 62, p.1163-1167, 2000.

TAVILANI, H., DOOSTI, M., NOURMOHAMMADI, I. *et al.* Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essencial fatty acids**, v.77, p. 45-50, 2007.

TEBET J.M. *et al.* Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, v. 66, p 1629-1632, 2006.

THUWANUT P. *et al.* The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, p. 233-240, 2008.

TSUTSUI, T., TANAKA, A., TAKAGI, Y., NAKAGAWA, K., FUJIMOTO, Y., MURAI, M., ANZAI, M., HORI, T. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. **Journal of Veterinary Medicine and Science** v. 62, p. 1247-1251, 2000.

TSUTSUI, T., WADA, M., ANZAI, M., HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.65, p. 397-399, 2003.

WALSCH, B.W., SCHIFF, I., ROSNER, B. *et al.* Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 17, p. 1196-1204, 1991.

WILDT, D.E. Endangered species spermatozoa: diversity, research and conservation. In: BARTKE, A. **Functions of somatic cells in the testis**. New York: Springer-verlang Inc.1994, p.1-24.

WILDT, D.E., BUSH, M., GOODROWE, K.L. *et al.* Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**, v.329, p.328-331, 1987.

WRIGHT, LC, NOURI-SORKABI, MH, MAY, GL *et al.* Changes in cellular and plasma membrane phospholipid composition after lipopolysaccharide stimulation of human neutrophils, studied by <sup>31</sup>P NMR. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, p. 328-335, 1997.

ZALATA A. A. *et al.* The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 111-118, 1998.

ZAMBELI, D., CANEPPELE, B., CASTAGNETTI, C. *et al.* Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, p.310-313, 2002.

ZHANG Y. *et al.* Testis-specific sulfoglycolipid, seminolipid, is essential for germ cell function in spermatogenesis. **Cryobiology**, v. 15, n. 6, p. 649-654, 2005.

## **CONCLUSÕES**

Com base nas condições experimentais aqui descritas e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Os defeitos espermáticos encontrados em amostras teratospérmicas “ocasionais” da cauda do epidídimo de gatos domésticos são similares àqueles de sêmen de ejaculado de gatos teratospérmicos, com maiores percentuais de defeitos primários e secundários, especialmente os defeitos de acrossoma e peça intermediária ou cauda dobradas, quando comparados com amostras normospérmicas,
2. Nenhum dos demais parâmetros físicos do sêmen, de biometria corporal ou testicular permitiu a diferenciação entre amostras normospérmicas e teratospérmicas;
3. Apesar de não ser detectada diferença nas concentrações sérica e intratesticular de testosterona e sérica estradiol entre amostras normospérmicas e teratospérmicas, as concentrações intratesticulares de estradiol e a proporção intratesticular entre testosterona e estradiol foram maiores nos gatos com teratospermia “ocasional” do que nos normospérmicos, sugerindo participação deste desequilíbrio entre androgênios/estrogênios intratesticular na gênese da teratospermia;
4. Animais teratospérmicos ocasionais não apresentam redução na taxa de apoptose celular no epitélio germinativo, nem tampouco aumento da produção espermática, como sugerido para animais teratospérmicos persistentes.
5. A membrana dos espermatozóides da cauda do epidídimo de gatos domésticos apresenta quantidades relativamente baixas de colesterol e fosfato e uma baixa proporção colesterol/fosfato e, em especial, naqueles animais cujas amostras de sêmen foram classificadas como teratospérmicas;
6. Aparentemente existe um efeito sazonal sobre o conteúdo de colesterol espermático, o qual é maior durante a primavera/verão em comparação

com o outono/inverno, porém a proporção entre colesterol:fosfolipídios aumenta durante os meses de outono/inverno;

7. Os espermatozóides da cauda do epidídimo apresenta uma grande variabilidade de espécies de lipídios, especialmente relacionada com a ocorrência de espécies de lisolipídios e resíduos de ácidos graxos predominantes da fosfatidilcolina, com uma quantidade, provavelmente, muito pequena de espécies de plasmalógenos.



## **ANEXOS**

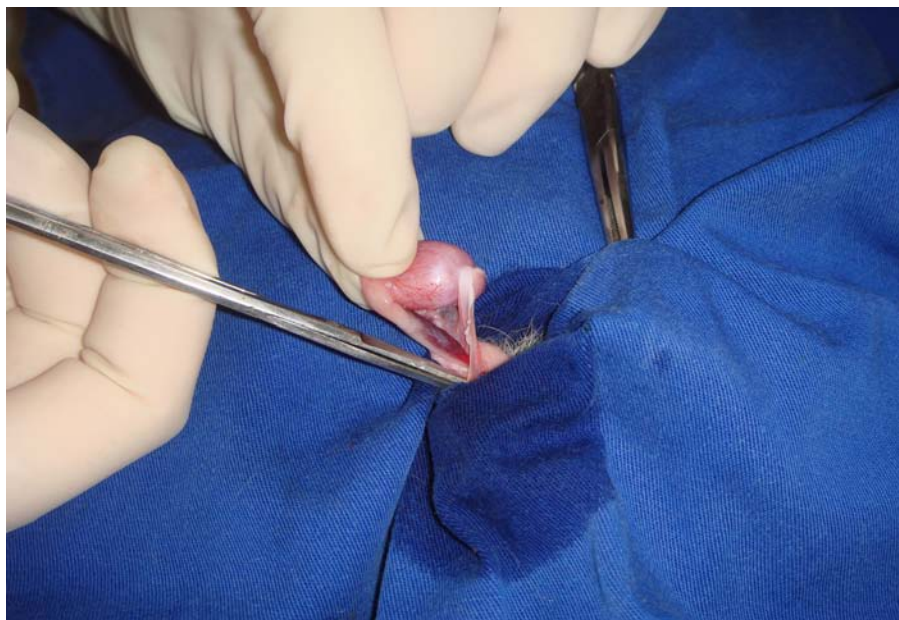


FIGURA 1. Imagem fotográfica do testículo de gato doméstico após a incisão da camada parietal da túnica vaginal durante orquiectomia. Pode-se observar o funículo espermático e a túnica vaginal.



FIGURA 2. Imagem fotográfica do testículo de gato doméstico após orquiectomia. Pode-se observar a presença do epidídimo ainda fixado ao testículo.

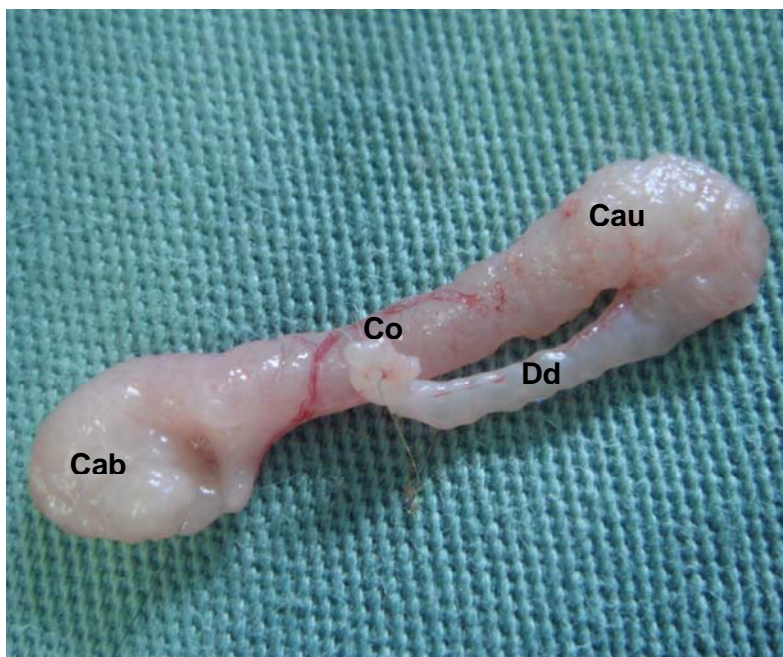


Figura 3. Imagem fotográfica do epidídimo de gato doméstico, com suas divisões clássicas: cabeça (Cab), corpo (Co) e cauda (Cau) e porção inicial do ducto deferente (Dd).

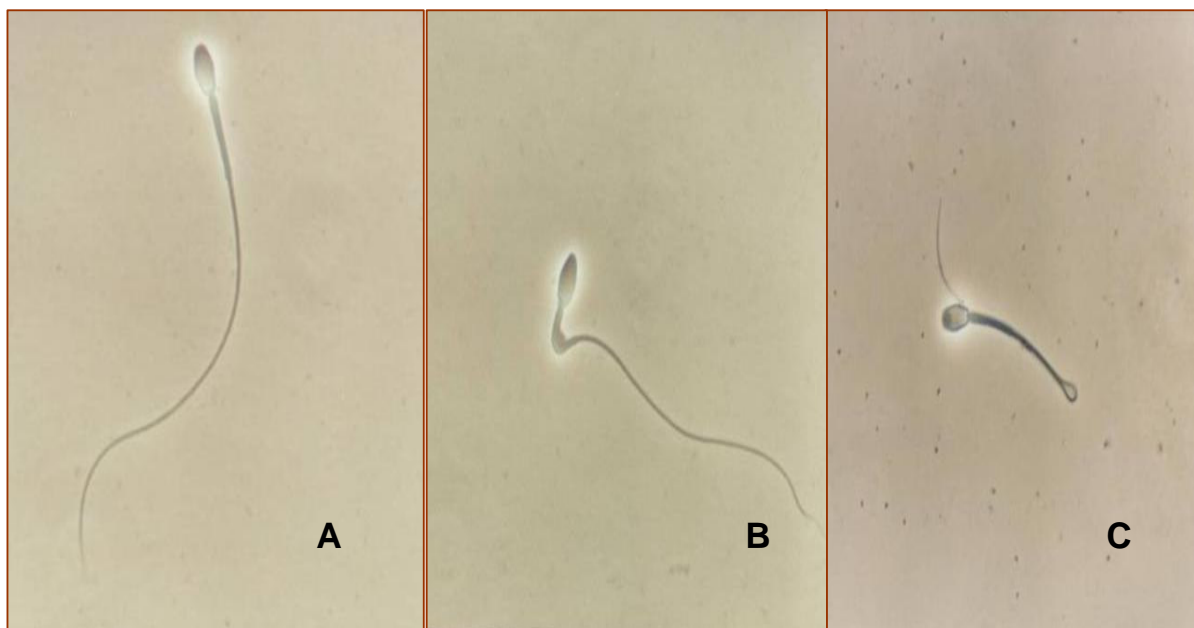


FIGURA 3. Imagens fotomicroscópicas de espermatozóides felino, morfologicamente normal (A), com peça intermediária dobrada com gota (B) e cauda dobrada sem gota (C). Fonte: MORAIS R.N., 2000.

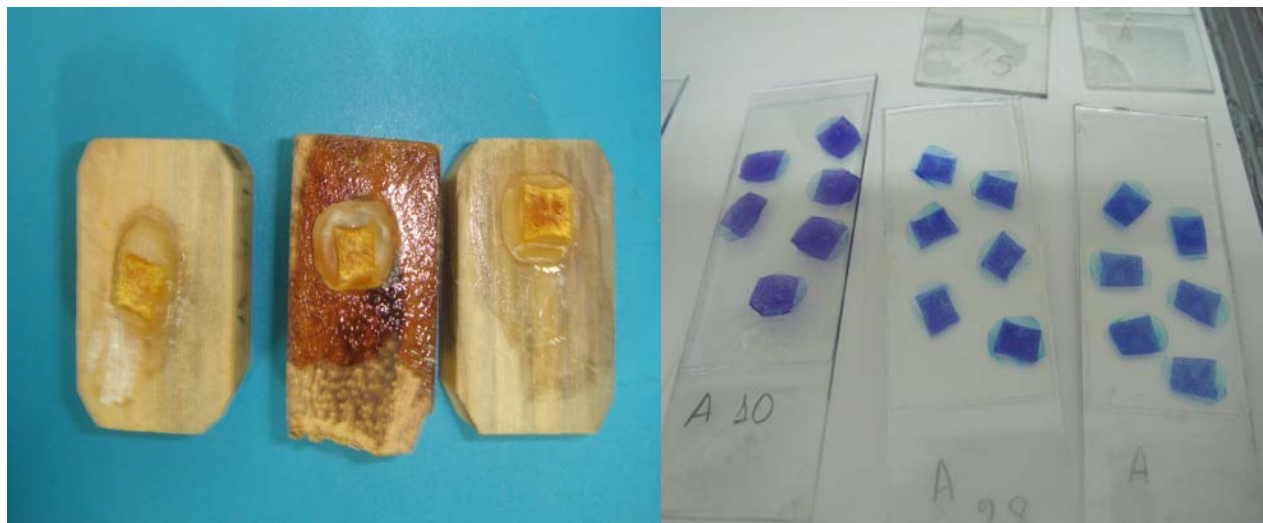


FIGURA 4. Imagem fotográfica de fragmentos testiculares emblocados em historesina à base de metilglicolmetacrilato (à esquerda) e dos microcortes testiculares de 3  $\mu$ m de espessura, corados com azul de toluidina e fixados em lâmina para análise microscópica (à direita).

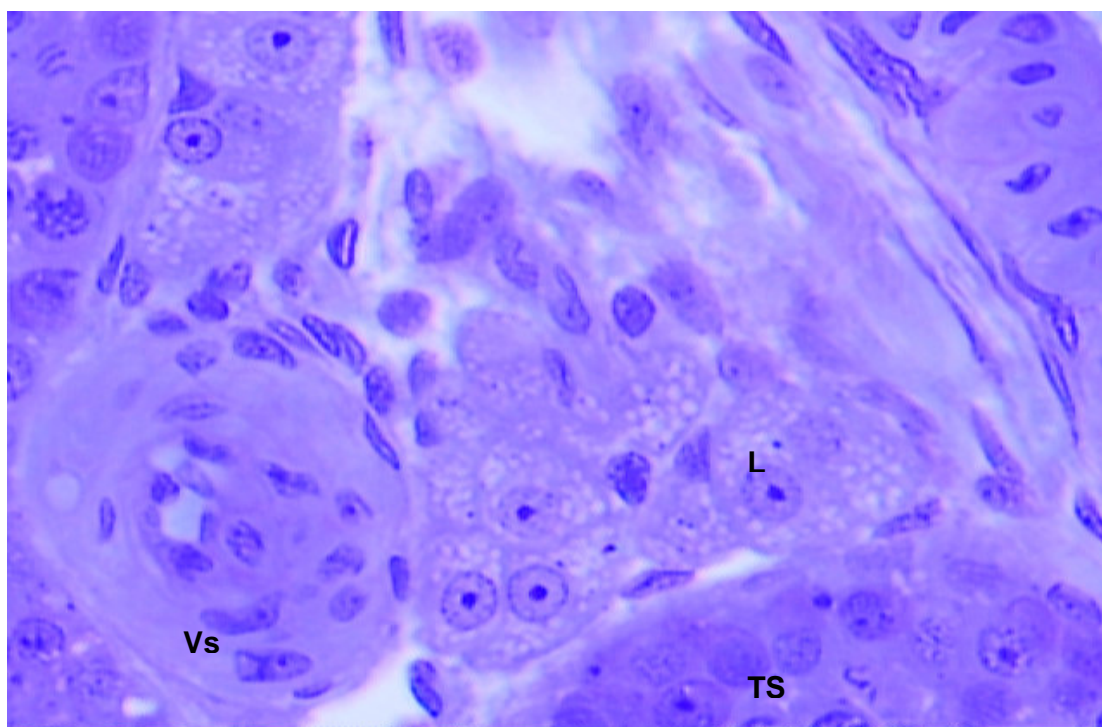


FIGURA 5. Imagem fotomicroscópica de túbulos seminíferos (TS) e espaço intertubular de testículo de gatos domésticos. Notar a presença das células de Leydig (L) e vasos sanguíneos (Vs). Ampliação de 100x, Azul de toluidina.



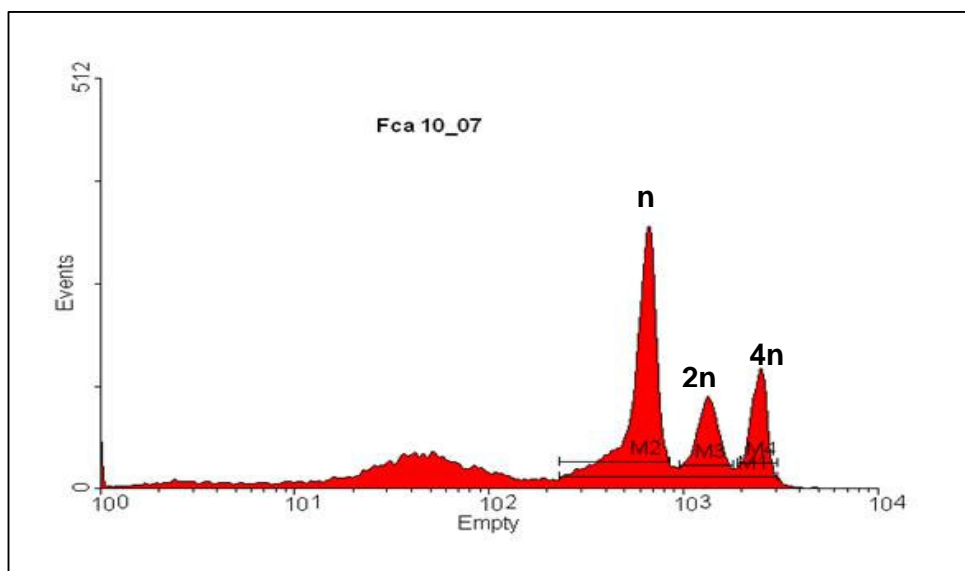


FIGURA 6. Histograma de células haplóides ( $n$ ), diplóides ( $2n$ ) e tetraplóides ( $4n$ ) de testículo de gatos domésticos, detectadas por meio de citometria de fluxo, utilizando-se como marcador o Iodeto de propídio.

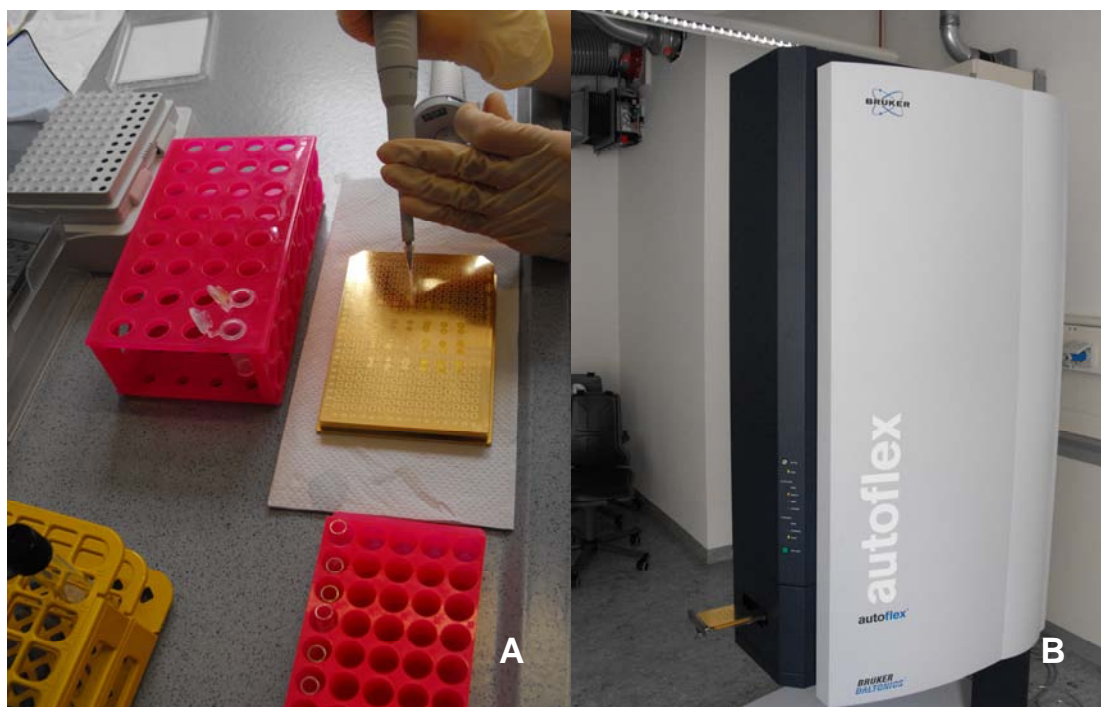


FIGURA 7. Imagens fotográficas de uma mistura de extrato de espermatozóides de gato doméstico e uma matriz sendo aplicada sobre placa de ouro para análise por espectrometria MALDI-TOF (A) e da introdução da placa contendo as amostras cristalizadas sendo aplicada em uma estação de trabalho Autoflex para análise (B).